

Untersuchungen zur
Karamelisierung von Zuckern

Josef Rothmoser

1981

Untersuchungen zur
Karamelisierung von Zuckern

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Josef Rothmoser
aus Baumgartenmühle
München 1981

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Th. Severin

2. Berichterstatter : Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung : 31. Juli 1981



Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter
Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Theodor Severin
am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der
Ludwig-Maximilians-Universität München. Für seine groß-
zügige Unterstützung und stets wohlwollende Hilfe möchte
ich Herrn Professor Severin meinen herzlichen Dank aus-
sprechen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I) Zusammenfassung

1

1.1 Die Polymersynthese

2

1.2 Die physikalischen Eigenschaften Polymerisierungen

Grundlagen

10

1.3 Wirkung von Katalysatoren bei Polymerisierungen

21

II) Analyse der Polymerisierungsprodukte

22

1.1 Gas- und Flüssigphase

a) Gasphasenmassenspektroskopie

23

b) Flüssigphasenmassenspektroskopie

24

c) Festphasenmassenspektroskopie

25

1.2 Festphasenmassenspektroskopie

26

a) Zerstreuung

26

b) Festphasenmassenspektroskopie

26

- Gasphase

26

- Festphasenmassenspektroskopie

26

- Festphasenmassenspektroskopie

26

- Festphasenmassenspektroskopie

26

III) Beschreibung von Polymerisierungsreaktionen

27

Frau Strecker möchte ich für die Anfertigung der NMR - Spektren sowie Herrn Dr. H. Lerche für die Unterstützung bei der Aufnahme und Interpretation der Massenspektren danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. X. Ledl für seine stets freundliche Diskussionsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis:

<u>Theoretischer Teil:</u>	Seite
I) Einleitung	1
1.) Die Maillardreaktion	2
2.) Die wichtigsten flüchtigen Zuckerumwandlungs- produkte	10
3.) Bildung von N-haltigen Zuckerabbauprodukten	21
II) Analytik der Bräunungsprodukte	22
1.) ohne Derivatisierung	
a) Dünnschichtchromatographie	23
b) Hochdruckflüssigkeitschromatographie	25
c) Gaschromatographie	30
2.) Derivatisierungsversuche	32
a) Silylierung	32
b) Methylierungsmethoden	34
- Diazomethan	34
- Methyljodid/Natriumhydrid	35
- Triäthyloxoniumtetrafluoroborat	36
- Thalliumäthylat/Methyljodid	36
III) Untersuchung von Bräunungsgemischen verschiedener Zucker	39
1.) Karamelisierung von Fructose und Maltose	41
2.) Karamelisierung mit Glycin	44
3.) Karamelisierung mit Methylammoniumacetat	
a) im Molverhältnis 2:1 bzw. 1:1	47
b) im Molverhältnis 10:1	52

	Seite
4.) Bräunungsreaktionen in wässriger Lösung	61
IV) Untersuchung von Roggenmischbrot	64
1.) Extraktionsverfahren	65
2.) Untersuchung von Fraktion I	66
3.) Versuche zur Derivatisierung von Fraktion II	68
a) Methylierung	68
b) Acetylierung: Nachweis von Mannit	76
V) Zusammenfassung	78

Experimenteller Teil

I.) Allgemeine Methoden	82
II.) Chromatographische Trennverfahren	83
1.) Dünnschichtchromatographische Trennung	83
2.) Hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung	83
3.) Gaschromatographische Trennung	84
III.) Derivatisierungsmethoden	84
1.) Silylierung	84
2.) Methylierung	85
a) mit Diazomethan	85
b) mit Methyljodid/Natriumhydrid	87
c) Alkylierung mit Triäthyloxonium-tetrafluoroborat	87
d) Methyljodid/ Thalliumäthylat	88
IV.) Bräunungsreaktionen	88
1.) Karamelisierung von Glucose und Fructose	88
2.) Karamelisierung mit Glycin	89

	Seite
1.) Karamellisierung mit Methylammoniumacetat	90
2.) Bräunung in wässriger Lösung	92
10.) Extraktion von Brotkruste und Untersuchung von Fraktion I	93
11.) Methylierung von Fraktion II	93
12.) Acetylierung: Nachweis von Mannit	94

THEORETISCHER TEIL

Die nichtenzymatische Bräunung, wie sie beim Erhitzen von Lebensmitteln, insbesondere beim Rösten, Braten und Backen eintritt, ist seit geraumer Zeit ein bedeutender Forschungsbereich der Lebensmittelchemie.

Die Lebensmittelinhaltstoffe, Fette, Kohlenhydrate und Eiweiß unterliegen ähnlich wie die meisten anderen organischen Substanzen bei höheren Temperaturen einem Zersetzungsprozess, der von einer allmählichen Farbvertiefung bis hin zur Verkohlung reicht.

Dieses Phänomen der Bräunung bedeutet für das Lebensmittel einerseits die Bildung von erwünschten Aroma- und Geschmackstoffen, andererseits aber auch eine Schädigung der Inhaltstoffe und damit eine Minderung der biologischen Wertigkeit. Die Anzahl der dabei ablaufenden Reaktionen ist wegen der komplexen Zusammensetzung der Lebensmittel entsprechend groß und deshalb schlecht zu überblicken. Es ist daher sinnvoll, die Zucker unter definierten Bedingungen in vereinfachten Modellversuchen umzusetzen.

In meiner Arbeit studierte ich u.a. das Verhalten von Mono- und Disacchariden beim Erhitzen.

Man unterscheidet drei Haupttypen des thermischen Zuckerabbaus.

- 1) Reaktionen, die beim trockenen Erhitzen (Karamelisieren) ablaufen,
- 2) durch Säuren katalysierte Reaktionen,

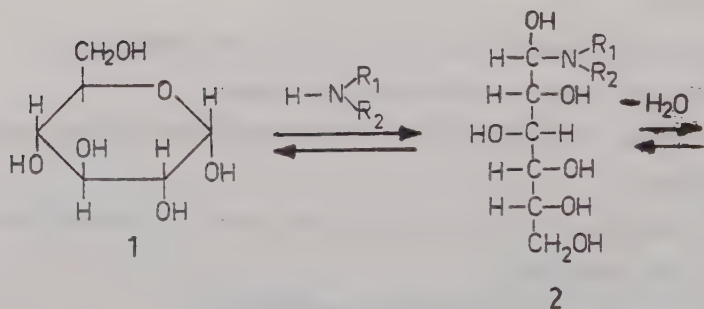
3) durch Amine oder Aminosäuren katalysierte Reaktionen. Letztere sind unter dem Begriff "Maillard - Reaktionen" zusammengefaßt. Sie haben die größte Bedeutung bei der nichtenzymatischen Bräunung. Dabei spielen vor allem freie Aminosäuren und im Eiweiß die endständige, nicht gebundene Aminogruppe des Lysins eine wichtige Rolle.

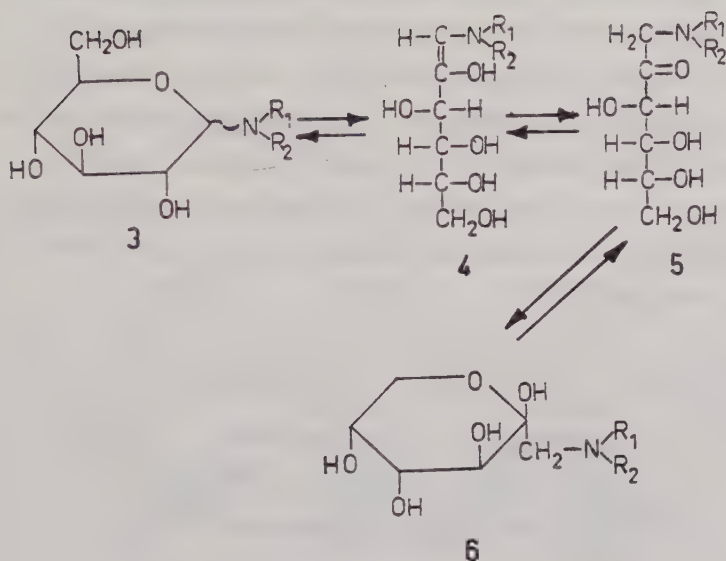
Eine Übersicht über die umfangreichen Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der nicht enzymatischen Bräunung geben Reynolds,¹⁾ sowie in neuerer Zeit Paulsen und Pflughaupt.²⁾

1.) Die Maillardreaktion

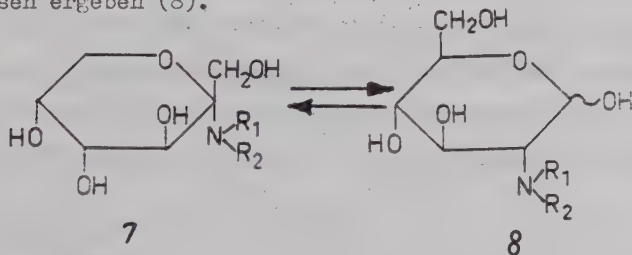
Im ersten Schritt der Maillard-Reaktion wird die Amin-Komponente reversibel an die Aldehydfunktion des reduzierenden Zuckers 1 angelagert. Das entstehende Aldosylamin 3 ist sehr instabil und geht leicht eine Amadoriumlagerung ein, die zu einer 1-Amino-1-deoxyketose (6) führt.

$R_1 = \text{H oder Alkyl}, R_2 = \text{Alkyl oder -Carboxylalkyl}$

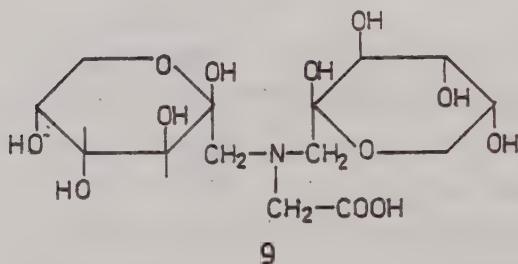




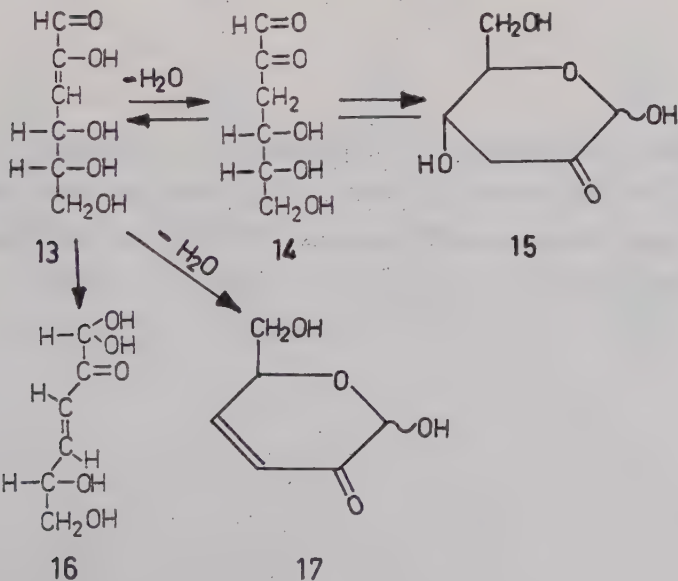
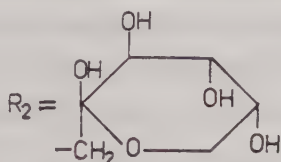
Ketosen reagieren unter gleichen Bedingungen mit Aminen oder Aminosäuren zu den entsprechenden Ketosylaminen (7), welche in der "Heyns-Carson-Umlagerung" 2-Deoxy-2-aminoaldosen ergeben (8).



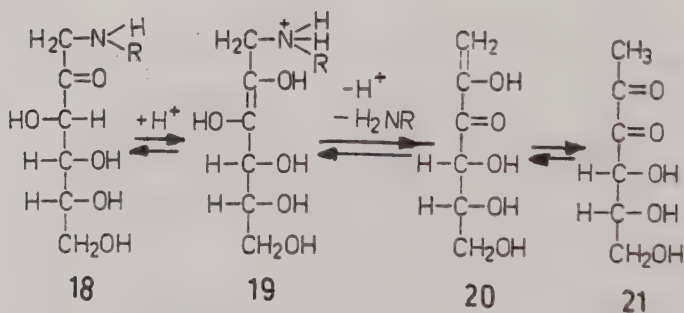
Amadoriprodukte freier Aminosäuren sind sowohl in Lebensmitteln wie auch in Modellansätzen nachgewiesen worden. Sie sind eine wichtige Zwischenstufe der Maillard-Reaktion und können zu einer Fülle von Folgeprodukten weiterreagieren. Im Falle eines primären Amins oder einer Aminosäure können sie mit einem weiteren Zuckermolekül ein Diketosamin bilden. Aus Glycin und Glucose entsteht so Difructoseglycin (9).



Das Verhalten von Difructoseglycin wurde von Anet eingehend untersucht. Es zersetzt sich leicht in schwach saurer wässriger Lösung beim Erhitzen und bildet die von dem Zucker abgeleitete 3-Deoxy-1,2-dicarbonylverbindung (14). Als Nebenprodukte entstehen das Cis- und das Trans-isomere des ungesättigten 3,4-Dideoxyglucosons. (17,16)



Monoketosamine aus primären Aminen reagieren im Vergleich zu Diketosaminen langsamer und nicht so eindeutig. Aus den isolierbaren Folgeprodukten läßt sich jedoch schließen, daß neben der β -Deoxy-1,2-dicarbonyl-Verbindung 14 auch die 1-Deoxy-2,3-dihexulose 21 als reaktive Zwischenstufe auftreten muß. Diese konnte allerdings noch nicht isoliert werden.

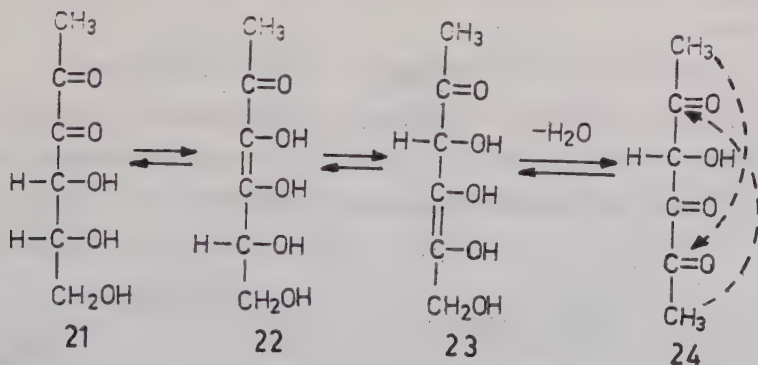


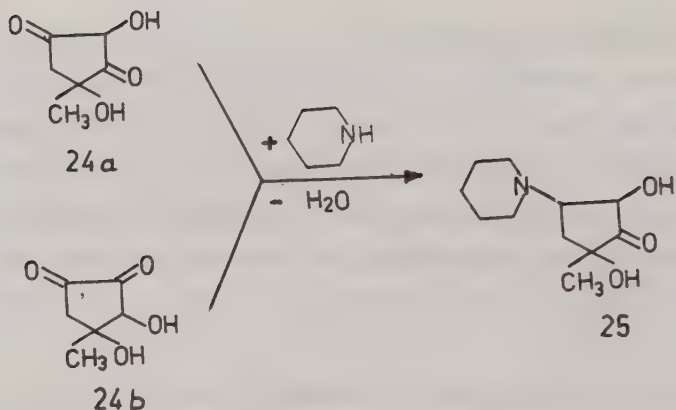
In jedem Fall wird die Aminkomponente bei der Bildung der α -Dicarbonylverbindungen wieder freigesetzt und kann erneut mit einem Zuckermolekül reagieren. Sie hat also Katalysatorfunktion.

Auch Modellversuche, bei denen Disaccharide mit sekundären Aminen umgesetzt werden, ergeben Abbauprodukte, die nur über eine 2,3-Dicarbonylverbindung entstanden sein können. Aus Maltose entsteht Maltol, aus Lactose bildet sich unter Katalyse von Piperidiniumacetat Isomaltol. Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Mono- und Disaccharide ist die glykosidische Bindung am C4-Atom.

Abbau von Ketosaminen aus sekundären Aminen

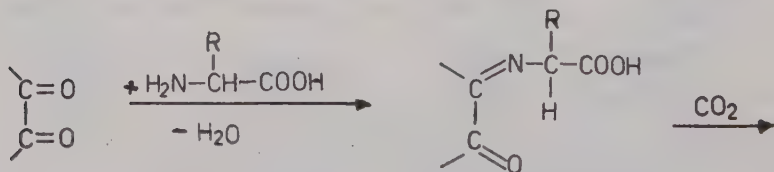
Hodge und Rist isolierten das sog. Piperidinohexoseredukton 25 aus den Abbauprodukten von 1-Deoxy-1-piperidino-fructose. Ein theoretisch möglicher Bildungsmechanismus verläuft über die 1-Deoxy-2,3-dicarbonylverbindung 21 :

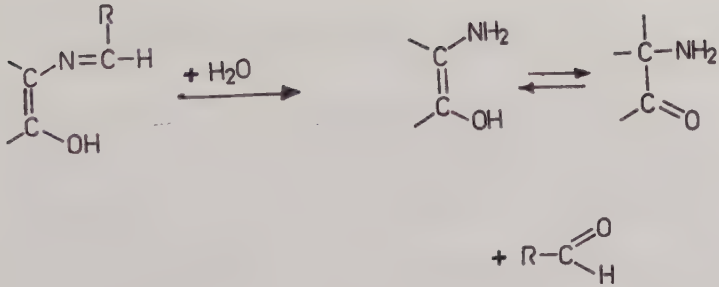




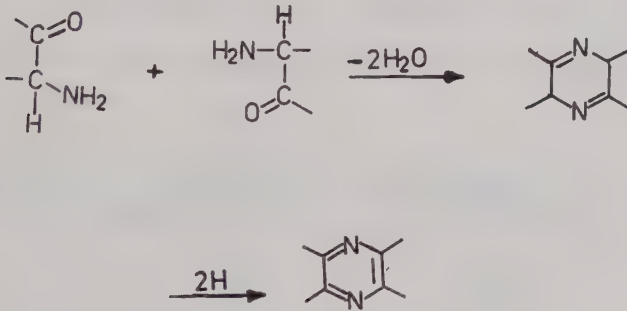
Ein analoges Redukton mit einem primären Amin konnte bis heute noch nicht isoliert werden, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es trotzdem gebildet wird. Reduktone sind in Lebensmitteln von Bedeutung, da sie als starke Reduktionsmittel einen oxidativen Verderb verzögern können.

Im Verlauf der Maillardreaktion werden Aminosäuren zu Aldehyden abgebaut. Für diese als Streckerabbau bekannte Reaktion ist die Reaktivität der aus den Kohlehydraten gebildeten Dicarbonylverbindungen verantwortlich.





Die dabei entstehenden α -Aminoaldehyde dimerisieren leicht zu Pyrazinen:



Pyrazine und auch Streckeraldehyde sind in verschiedenen Röstaromen gefunden worden, so z.B. in Popcorn und gerösteten Nüssen.

2. Die wichtigsten Zuckerumwandlungsprodukte:

Für meine Arbeit waren die folgenden Substanzen von besonderem Interesse. Sie gehören zu den flüchtigen Hauptprodukten der nichtenzymatischen Bräunung und entstehen aus einer Hexose durch mehrmalige Wasserabspaltung und Cyclisierung, wobei die ursprüngliche Kohlenstoffkette erhalten bleibt.

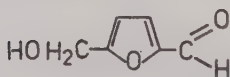
5-Hydroxymethyl-furan-2-carbaldehyd 26

2-Hydroxyacetylfuran 27

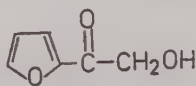
3,5-Dihydroxy-5,6-dihydro-2-methyl-4H-pyranon 28

Maltol 29

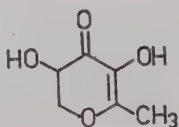
Isomaltol 30



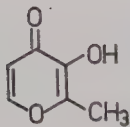
26



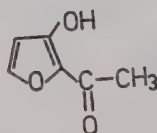
27



28



29



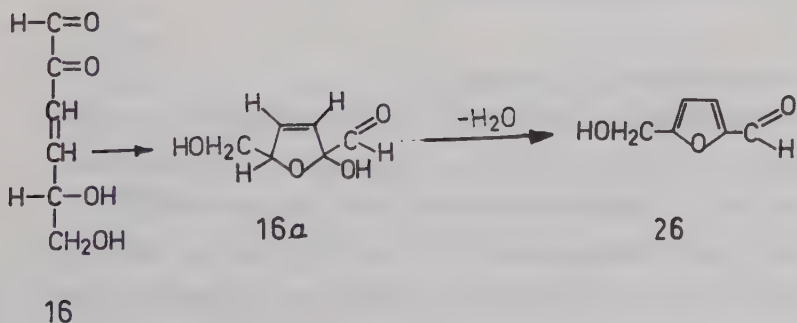
30

5-Hydroxymethyl-furan-2-carbaldehyd: (26)

wird beim Erhitzen von reduzierenden und nichtreduzierenden Mono- und Disacchariden mit und ohne Amin-Katalyse, vor allem aber bei der Säurebehandlung von Zuckern als flüchtiges Hauptprodukt gebildet.

Es ist in verschiedenen kohlenhydrathaltigen Lebensmitteln enthalten: in Fruchtsäften, Marmeladen, in Kunsthonig und Brot, aber auch in Zigarettenrauch wurde es nachgewiesen. In Wein ist 26 mit ca. 5mg/l in relativ großer Menge enthalten, ein Beweis dafür, daß es auch schon entsteht, wenn Zucker bei Raumtemperatur unter sauren Bedingungen gelagert werden. Auch in Orangensaftpulver ist es nachweisbar.

Der Reaktionsweg verläuft ausgehend vom Oson 16 über ein cyclisches Halbacetal, welches zum Furan dehydratisiert wird.



Hergestellt wird 26 meist durch Säurebehandlung von Saccharose, Glucose oder Fructose in Ausbeuten bis zu 54%. Als Nebenprodukt entsteht Bis-(5-formyl-2-furfuryl)-äther. Neuerdings wird es auch aus Saccharose durch Erhitzen in trockenem Dimethylformamid, welches katalytische Mengen Jod enthält, hergestellt.²⁾

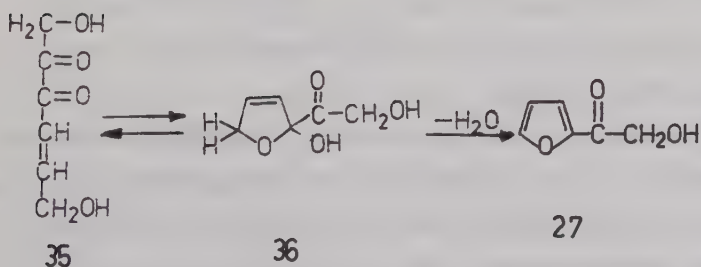
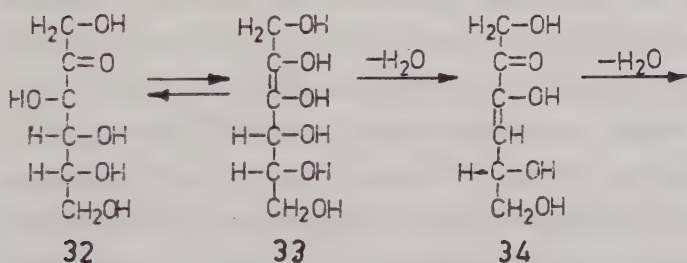
Nachgewiesen und isoliert wurde 26 mit verschiedenen chromatographischen Methoden. Für die Dünnschichtchromatographie sind eine große Anzahl von Laufmittelsystemen beschrieben worden. Zur Detektion benutzt man entweder die Absorption von UV-Licht oder verschiedene Sprühreagenzien. Auch gaschromatographisch ist es gut bestimmbar. Hierzu eignen sich gepackte sowie Kapillarsäulen mit mittel- bis unpolaren stationären Phasen.

2-(2-Hydroxyacetyl)-furan (27)

Wurde von Miller und Cator als Nebenprodukt bei der Herstellung von 26 aus Saccharose gefunden.⁴⁾ Es tritt neben 26 vor allem beim Zuckerabbau unter sauren Bedingungen und beim Karamelisieren auf, wird aber auch in Bräunungsreaktionen, die durch primäre Amine oder Aminosäuren katalysiert werden gebildet.

Aus Fructose entsteht es in wesentlich besseren Ausbeuten als aus Glucose.⁴⁾

Ein Reaktionsmechanismus wurde von Anet ⁵⁾ vorgeschlagen. Er führt ausgehend von Fructose (32) über eine Enolisierung und anschließende zweimalige Wasserabspaltung zu einer ungesättigten 2,3-Diketoverbindung 35, die dann unter erneuter Dehydratisierung zu Hydroxyacetylfuran cyclisiert.



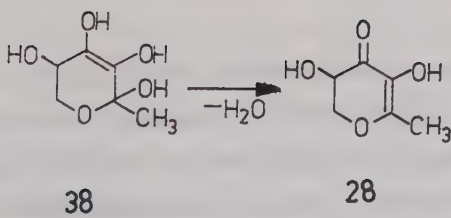
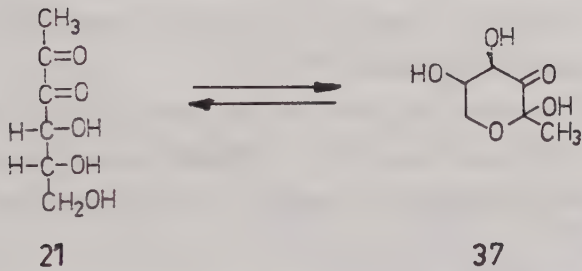
Es findet sich u.a. in Zigarettenrauch, in gelagertem Orangensaft, gebräuntem Milchpulver und in Wein.

2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (28)

wurde von Shaw, Tatum und Berry im Orangensaftpulver entdeckt ⁸⁾ und auch beim sauer katalysierten Fructoseabbau nachgewiesen. Severin und Seilmeier fanden dasselbe Produkt bei der Umsetzung von Glucose mit Methylammoniumacetat. ⁹⁾ Mills und Hodge isolierten 28 aus dem flüchtigen Anteil der Vakuumpyrolyseprodukte von 1-Deoxy-1-(L-prolin)-D-fructose zu 50% ¹⁰⁾ und aus Sarcosino-fructose zu 63% ²²⁾. Shigematsu fand es beim Abbau von Glucose mit Prolin. Wie Ledl, Schnell und Severin zeigen konnten, ¹²⁾ ist 28 in Lebensmitteln häufig zu finden. Sie wiesen es in gekochten Gemüsen, erhitztem Fleisch, in Bonbons und in Brotkrusten nach, sowie als Bräunungsprodukt von Mono- und Disacchariden, die mit und ohne Zusatz von Amin erhitzt wurden. Tressl ¹³⁾ fand es in Kaffee und Safizadeh ¹⁴⁾ bei der Pyrolyse von Zellulose. Auch in Zigarettenrauch ist 28 nachgewiesen worden.

Der Bildungsweg verläuft über die 1-Deoxy-2,3-diketoverbindung 21, die bevorzugt aus dem Amadoriprodukt von sekundären Aminen entsteht, aber auch im Säuren in geringer Menge gebildet werden kann. Der Ringschluß erfolgt durch

die Bildung eines Halbacetals der Carbonylgruppe am C2-atom mit der Oli-Gruppe am C6.



In Verbindung 28 liegt das Strukturelement eines Reduktionäthers vor, sie ist daher leicht oxylierbar. Möglicherweise kommt ihr dadurch eine stabilisierende Wirkung im Lebensmittel zu. Schon nach längerem Stehen an der Luft ist 3,5-Dihydroxy-6-methyl-4H-Pyranon nachweisbar. Ob bei der Oxydation auch noch andere Produkte entstehen, muß noch geprüft werden.

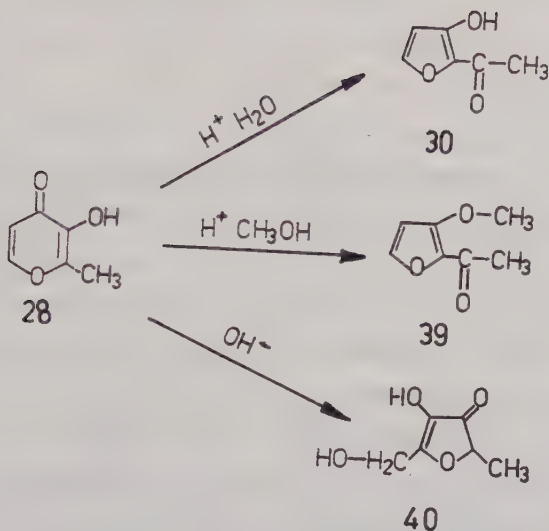
Sowohl im Säuren wie auch im Alkalischen finden Reaktionen unter Ringöffnung statt. Behandelt man 28 mit methanolischer Salzsäure, so reagiert es zum Isomaltolmethyläther ³⁹⁾ $\rightleftharpoons$.

Ito findet bei der Zersetzung von Saccharose in wässriger Lösung und anschließender Wasserdampfdestillation bei pH 2,5 große Mengen von Isomaltol aber kein 3,5-Dihydroxy-6-methyl-4H-Pyranon ¹⁵⁾ $\rightleftharpoons$.

Auch ich konnte feststellen, daß bei der Wasserdampfdestillation von 28 unter sauren Bedingungen reines Isomaltol entsteht.

Mills ¹⁶⁾ $\rightleftharpoons$ zeigte, daß 28 in Gegenwart von 1N-Natronlauge zu 2,3-Dihydro-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-~~4~~ methyl-furan-3-on (40) reagiert. Eine direkte Dehydratisierung von 28 zu Maltol ist nur unter drastischen Bedingungen und in schlechten Ausbeuten möglich z.B. mit Thionylchlorid in Pyridin. ¹⁷⁾ $\rightleftharpoons$

Sie ist also unter Bedingungen der Lebensmittelverarbeitung nicht zu erwarten.



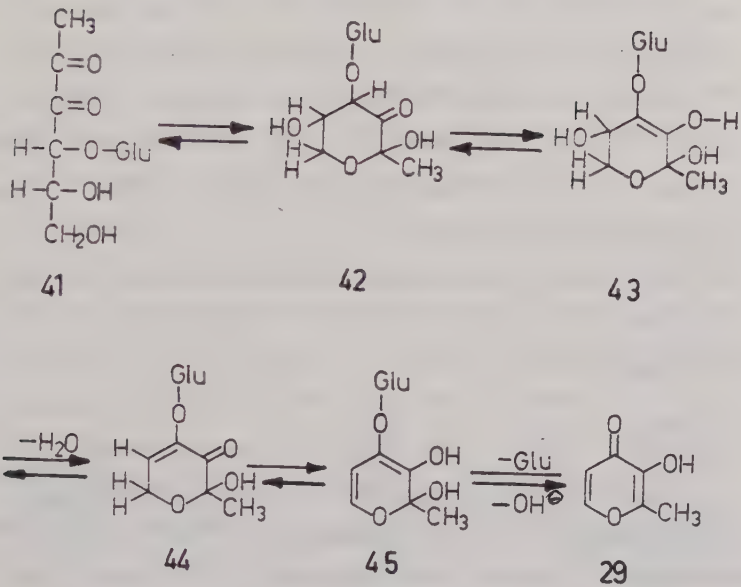
Maltol (29)

ist ein typisches Produkt der nichtenzymatischen Bräunung von reduzierenden Disacchariden mit Aminen und Aminosäuren. Es ist in vielen erhitzten Lebensmitteln zu finden. Schon früh wurde es aus Lärchenrinde isoliert,¹⁸⁾ später aus geröstetem Malz.¹⁹⁾ Man findet es beim trockenen Erhitzen von Stärke und Cellulose²⁰⁾ in Tabakrauch, Schokolade, gebräunter Butter, Bier, Brotkruste und in Röstkaffee. Als Naturstoff kommt es in einigen Coniferenarten als O-Glycosid vor.²¹⁾

Für Maltol sind viele Synthesen beschrieben worden.

Es ist für die Aromaindustrie von Bedeutung und wirkt als Geschmacksverstärker für Süß- und Rauchwaren.

29 wird deshalb vielen Aromavormischungen zugesetzt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß das 2-äthylhomologe um ein Vielfaches stärker wirkt als das natürlich vorkommende Maltol.²²⁾ Bei der Umsetzung von 29 mit schwefelhaltigen Aminosäuren und mit Sulfiden erhält man Aromakonzentrate, die den Fleischgeschmack positiv beeinflussen bzw. imitieren. Neuerdings wurde es auch beim Abbau von Deoxyprolinofructose¹⁰⁾ und Deoxysarcosino-fructose¹¹⁾ gefunden. Es entsteht also auch aus den Anadoriprodukten von Monosacchariden. Der Bildungsmechanismus verläuft vermutlich von der 1-Deoxy-2,3-diketoverbindung 41 ausgehend, ähnlich wie bei der Verbindung 28. Da jedoch die Sauerstofffunktion am C4-Atom im Disaccharid glycosidisch gebunden ist, erfolgt Eliminierung von Wasser unter Ausbildung der Doppelbindung zwischen C4 und C5. Anschließend wird vermutlich der Glucoserest abgespalten und durch gleichzeitigen Austritt der OH-Gruppe in 2-Stellung die Pyronstruktur gebildet.



Isonaltol (30)

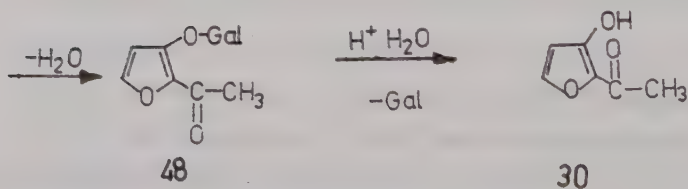
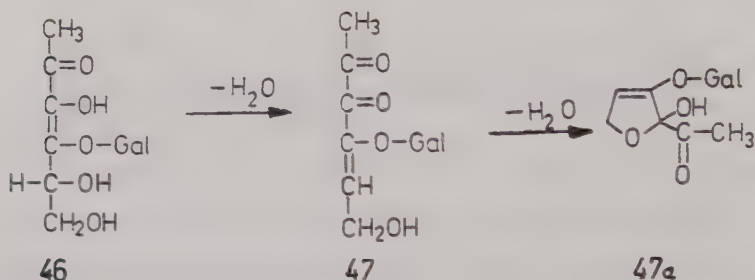
Diese Verbindung wurde schon 1924 von Bake in einem mit Milch gebackenen Brot gefunden und durch O-Methyl- und O-Benzyl-derivate charakterisiert. Als Nachweis benutzte er die Farbreaktion mit Eisen-III-chlorid. Erst 1961 wurde es aus Lactose mit Piperidin in einem schwach alkalischen Pyridinpuffer hergestellt.²³⁾

Fisher und Hodge konnten die Struktur aufklären und zei-

nen, daß durch Dehydratisierung des Glucoseanteils zuerst O-Galactosyl-isomaltol (48) entsteht, aus welchem entweder thermisch oder durch Wasserdampfdestillation mit 1 molarer Phosphorsäure Isomaltol freigesetzt wird. Aus Maltose konnten sie unter denselben Bedingungen lediglich 1-Deoxy-1-piperidino-maltulose isolieren, welche im Säuren kein Isomaltol bildet.

In 30 liegt das Strukturelement einer vinylogenen Carbonsäure vor. ($pK_a=5,7$)

Bildungsmechanismus:

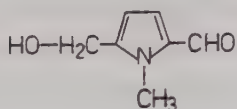


Isomaltol wurde in Spuren in Kaffee und Kakao, Ahornsirup und Bier nachgewiesen. Sein Aroma wird mit süß-caramel-artig bis fruchtig beschrieben.²⁵⁾

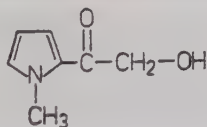
3. Bildung von N-haltigen Zuckerabbauprodukten.

Führt man die Maillard-Reaktion mit prim. Aminen durch, so werden neben den oben beschriebenen sauerstoffhaltigen Heterocyclen auch N-haltige Verbindungen gebildet. In Bräunungsansätzen von Hexosen mit Methylamin findet man z.B. 5-Hydroxymethyl-1-methyl-2-formylpyrrol (49). Auch das 1-Methyl-2-(hydroxyacetyl-)pyrrol (50) ist bekannt. A.Loidl isolierte 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-pyridon 51 aus den Umsetzungsprodukten von Maltose mit Methylammonium-acetat. Er konnte zeigen, daß diese Verbindung sowohl aus Maltol wie auch aus Isomaltol gebildet wird. Aus Isomaltol entsteht in geringen Mengen das Pyrrol-derivat 52 ⁽²⁹⁾.

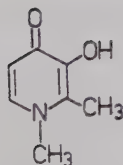
Von 5,6-Dihydro-3,5-dihydroxy-2-methylpyran-4H-pyranon ist bisher kein N-analoges Produkt bekannt. Ein O-N-Aus-tausch erfolgt bei dieser Verbindung offensichtlich nicht.



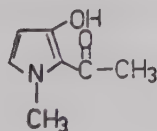
49



50



51



52

II Analytik:

Das häufige Vorkommen der bisher beschriebenen Substanzen, ihre Bedeutung als Aroma- und Geschmackstoffe, wie auch als Indikatorsubstanzen für eine Hitzebehandlung, macht sie für die Lebensmittelanalytik besonders interessant. Dies gilt nicht zuletzt deshalb, weil bei einigen Bräunungsprodukten eine geringe mutagene Wirkung festgestellt wurde, wodurch die gesundheitliche Unbedenklichkeit zumindest in Frage gestellt wird. 27) 28) 29)

In erhitzten Lebensmitteln und in gebräunten Zuckern wurden mit so empfindlichen Methoden wie z.B. der Kappilar-GC-MS-Technik mehrere hundert flüchtige Röstprodukte nachgewiesen, die zum Teil nur in äußerst geringen Konzentrationen auftreten.

In meiner Arbeit habe ich die aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren und im Hochvakuum destillierbaren Zuckerabbauprodukte untersucht. Dabei beschränkte ich mich auf die der Menge nach am häufigsten vorkommenden Substanzen. Ich erprobte zuerst an Modellgemischen von Reinsubstanzen verschiedene chromatographische Trennmethoden, um dann mit Hilfe dieser Verfahren verschiedene gebräunte Zucker und Brotkruste zu untersuchen.

1a) Dünnschichtchromatographie

Zur dünn-schichtchromatographischen Trennung benutzte ich kieselgelbeschichtete Aluminiumfolie mit anorganischem Fluoreszenzindikator.

Als geeignetes Fließmittel erwies sich ein Gemisch von Methylenchlorid, Hexan und Methanol im Volumenverhältnis 70:30:2. Bei einer Laufstrecke von 10 cm erreichte ich eine Trennung von folgenden Substanzen:

	Rf-Werte
(56) Furfurol	0,85
(30) Isomaltol	0,80
(27) Hydroxyacetylfuran	0,58
(49) 5-Hydroxymethyl-1-methyl-2-formylpyrrol	0,45
(26) Hydroxymethylfurfurol	0,40
(29) Maltol	0,32
(28) 5,6-Dihydro-3,5-dihydroxy-2-methyl-4H-Pyranon	0,17
(51) 1,2-Dimethyl-3-hydroxypyridon	0,04

Die Rf-Werte können durch unterschiedliche Konzentrationen der aufgetragenen Substanzen geringfügig beeinflusst werden.

Alle Substanzen zeigen Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, können also durch Bestrahlen mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für eine sichere Zuordnung ist ein Besprühen der entwickelten Chromatogramme mit methanolischer Eisen-III-Chlorid-Lösung und anschließend mit einer methanolischen Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) günstig.

Nach dem Besprühen mit FeCl_3 färben sich :

28 blau, verblaßt nach ca 4 Minuten

51 blau, verblaßt beim Besprühen mit DNPH
läßt sich wieder anfärben.

29 violett

30 violett, verblaßt beim Besprühen mit DNPH

Nach dem Besprühen mit DNPH und zweiminütigem Trocknen mit Heißluft (Laborföhn) färben sich:

56 grau

27 schwach orangerot

26 intensiv orangerot

51 graubraun.

Die Dünnschichtchromatographie ist für einen schnellen Überblick über die in einem Gemisch vorhandenen Hauptprodukte sehr gut geeignet. Bei sehr heterogenen Substanzgemischen kommt es jedoch infolge der begrenzten Trennleistung zu Überlagerungen mit anderen Substanzen, wodurch eine eindeutige Zuordnung erschwert wird.

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wird u.a. auch zum Nachweis und zur Bestimmung von Kohlenhydraten eingesetzt. Als Detektor benutzt man dabei ein Refraktometer.

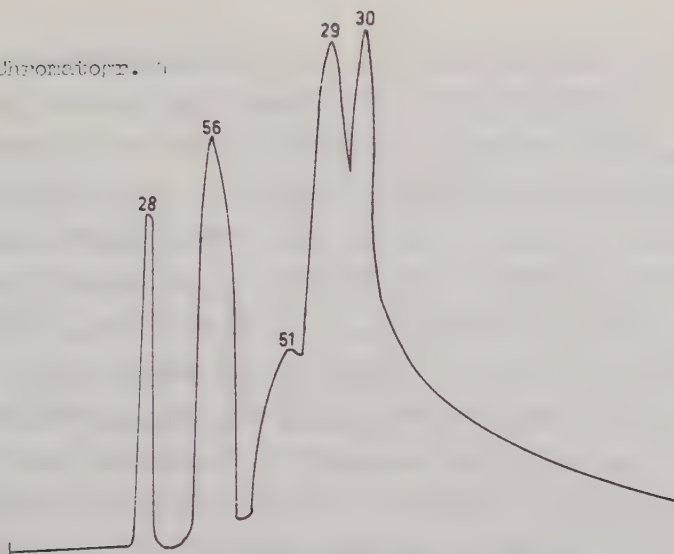
Für die Analyse von Karamelisierungsprodukten bietet die Hochdruckflüssigkeitschromatographie mehrere Vorteile. Zum einen können polare, nicht flüchtige Substanzen, die mit Hilfe der Gaschromatographie nicht mehr erfaßbar sind direkt nachgewiesen werden, zum anderen können durch den Einsatz eines UV-Detektors selektiv die Verbindungen erfaßt werden, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. Man kann also die beschriebenen Produkte, die aus Zuckern durch mehrmalige Wasserabspaltung entstanden sind und dabei konjugierte π -Elektronensysteme ausbilden, direkt in wässrigen Lösungen nachweisen. Nicht umgesetzte Zucker, Osone und Amadoriprodukte stören dabei nicht.

Ich benutzte zur Trennung von Modellgemischen eine reversed Phase Säule "Bondapack C 18". Als Elutionsmittel diente ein Gemisch von 95 Teilen Wasser und 5 Teilen Methanol. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. (siehe Chromatogramm Nr. 1 und 2).

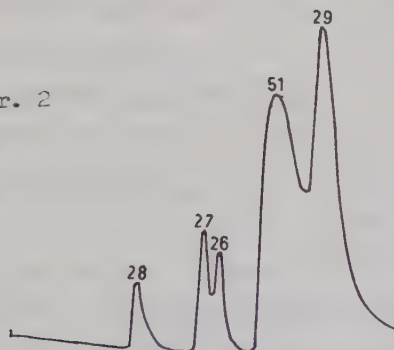
Es ergeben sich folgende Retentionszeiten (in Minuten):

<u>29:</u>	19,6	<u>27:</u>	11,6	<u>56:</u>	12,0
<u>30:</u>	21,2	<u>28:</u>	8,0	<u>49:</u>	33,0
<u>26:</u>	12,6	<u>51:</u>	17,0		

Chromatogr. 1



Chromatogr. 2



Wie aus den abgebildeten Chromatogrammen ersichtlich, zeigen die Verbindungen 51 und 29 starke Tailingeffekte und werden nur unvollständig getrennt. Auch 27, 26 und 56 liegen sehr dicht nebeneinander, so daß z.B. geringe Mengen 27 neben 26 nicht zu bestimmen sind. Wenn größere Mengen dieser Substanzen auf die Trennsäule gegeben werden, kommt es leicht zu Peaküberlappungen. Die erreichte Trennung ist noch nicht optimal. Eine Anwendung von Trennsäulen mit chemisch modifizierten Oberflächen z.B. Bondapack-CN oder Bondapack-NH₂ und die Verwendung von Gradientenelution wäre sicher sinnvoll. Man könnte erwarten, daß sich die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie auch auf die Hochdruckflüssigkeitschromatographie übertragen lassen. Ich konnte jedoch auf Kieselgelsäulen keine Trennung der oben genannten Substanzen erreichen. Auf der polaren stationären Phase werden Maltol und vor allem das Pyridon 51 so stark absorbiert, daß zur Elution hohe Konzentrationen Alkohol erforderlich sind, dies bewirkt aber eine Peaküberlappung bei 27, 26 und 28.

1c Gaschromatographie:

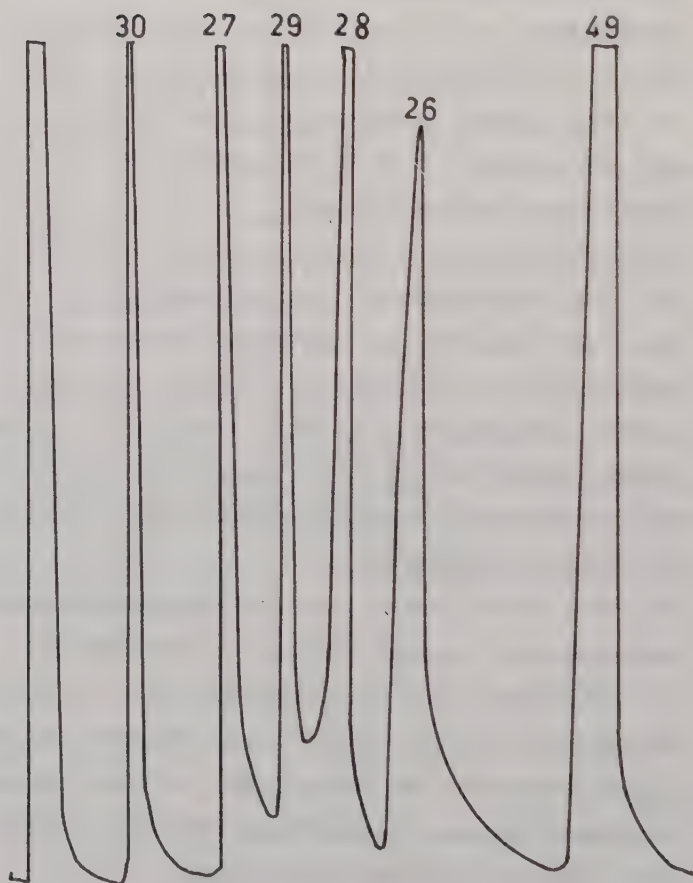
Die Gaschromatographie ist seit langem als Trennverfahren für flüchtige Verbindungen eingeführt. Durch die Verwendung von Kapillarsäulen und die Kopplung mit einem Massenspektrographen wurde sie zu einer hochempfindlichen und leistungsfähigen Analysenmethode entwickelt, mit deren Hilfe aus den flüchtigen Anteilen von verschiedenen Aromaextrakten z.B. aus Brot, Kaffee oder Kakao mehrere hundert Verbindungen isoliert und identifiziert werden konnten.

Die Substanzen 26 bis 30 sind auf Grund ihrer Flüchtigkeit ohne Derivatisierung gaschromatographisch bestimmbar. Meine Versuche, die genannten Verbindungen mit gepackten Stahlsäulen mittlerer Polarität zu trennen, zeigten, daß sich SE 52 -, SE 30 - und OV 17 - Säulen für dieses Trennproblem am besten eignen, u.a. wegen der hohen thermischen Belastbarkeit. Auch CW 20 M - und QF 1 - Säulen wurden eingesetzt.

Zwar steht außer Zweifel, daß mit Glaskapillarsäulen eine wesentlich bessere Trennung zu erreichen ist.

Die Belastbarkeit der gepackten Säulen ist jedoch höher, was besonders bei der Analyse eines Gemisches mit unbekannten Substanzen von Vorteil ist, da die zu identifizierende Komponente aufgefangen und dann leichter in ihrer Struktur aufgeklärt werden kann.

Chromatogr. 3



Eine Trennung von 26, 27, 28, 29, 30 und 49 erreichte ich auf einer Stahlsäule mit 2,5% Se52. (Chromatogr. 3)
Temperaturprogramm: 100°C, 15 Minuten, dann mit 2°C/Minuten bis 280°C aufheizen.

Es ergeben sich folgende Retentionszeiten: (in Minuten)

30: 9,27; 27: 15,23; 29: 18,56; 26: 26,91; 49: 39,1.

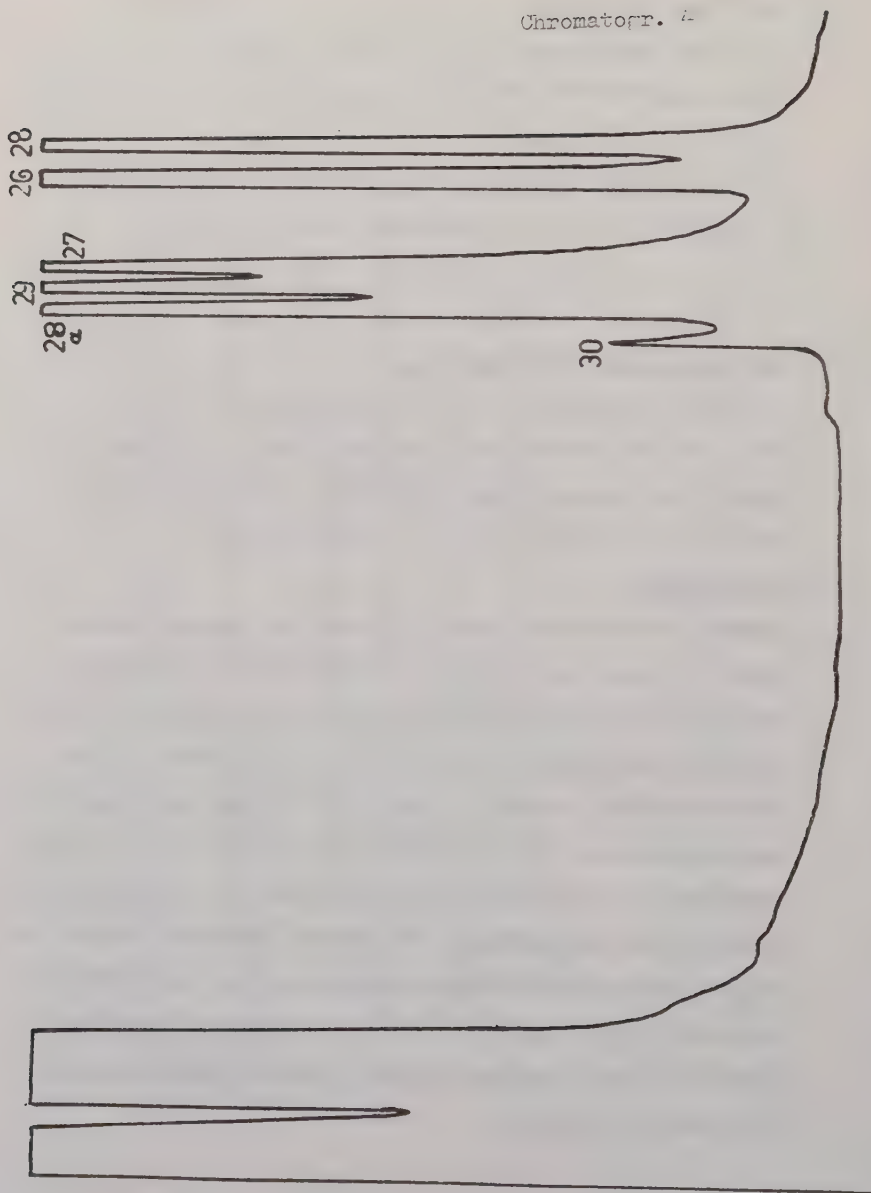
2.) Versuche zur Derivatisierung:

Ich suchte nach Derivatisierungsmethoden, die geeignet sind, den mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Anteil von Zuckerbräunungsprodukten in gaschromatographisch gut erfassbare Derivate überzuführen.

2a) Silylierung:

Zuckerabbauprodukte können silyliert und gaschromatographisch getrennt werden.³⁰⁾ Ich konnte durch Verwendung von N-Methyl-N-trimethylsilylhexafluorobutyramid(MSHFBA) in Äther eine bequeme Derivatisierung erreichen. Eine Trennung gelang mir auf einer OV 17 - Säule mit einem Temperaturprogramm 50°C bis 280°C; Rate 1°C/min. (Siehe Chromatogramm 4). Durch MSHFBA werden flüchtige Trimethylsilylderivate von Carbonsäuren, Alkoholen, Phenolen, Aminen und Aminosäuren gebildet. Durch das sehr große Atomverhältnis F:Si von 7:1 entstehen bei der Verbrennung im Detektor flüchtige, nicht verunreinigende oder gar korrodierende Siliciumverbindungen.

Chromatogr. 2



Ein genereller Nachteil der Trimethylsilylderivate besteht darin, daß die Fragmentierungsmuster der Massenspektren von denen der unterivatisierten Ausgangsverbindungen stark abweichen, so daß man bei der GC/MS-Analyse von unbekannten Verbindungen auf Spektren von Vergleichsubstanzen angewiesen ist.

2b) Methylierungsmethoden:

Aus diesem Grund suchte ich nach geeigneten Verfahren, durch die sich die Modellssubstanzen in O-Methylderivate überführen lassen. Die Methyläther sind im Vergleich zu den Silyläthern wesentlich stabiler und geben leichter interpretierbare Spektren. Die Schwierigkeit liegt allerdings darin, ein Verfahren zu finden, das sowohl Enole wie auch Alkohole möglichst schonend und quantitativ methyliert und gleichzeitig Nebenreaktionen anderer reaktiver Gruppen weitgehend verhindert.

Diazomethan:

Die Methyläther von Maltol und Isomaltol sind schon seit längerem bekannt. Die relativ sauren enolischen Gruppen sind leicht mit Diazomethan alkylierbar.

Auch alkoholische OH-Gruppen, wie sie in 26 und 27 und 28 vorliegen, sollten mit Diazomethan unter Zusatz von Bortrifluorid methylierbar sein. Ich stellte jedoch fest, daß sich diese Substanzen bei Zugabe von BF_3 unter Zersetzung dunkel färben. Eine Methylierung ist mir auf diesem Wege nicht gelungen.

Kiyotaka Ohno und Mitarbeiter ²¹⁾ berichten über eine Methylierung von Alkoholen und Phenolen mit Diazomethan in Äther, wobei die Substanzen auf Kieselgel aufgezogen werden. Diese Methode führt zwar auch bei 26 und 27 zu einem einheitlichen Methylierungsprodukt, es ist jedoch ein sehr großer Überschuß an Diazomethan (bis zu 100 Mol) erforderlich, weshalb sich diese Methode für die Derivatisierung größerer Mengen nicht eignet.

Methyljodid/Natriumhydrid:

Diese Variante der Äthersynthese nach Williams wird in der präparativen Chemie oft zur Methylierung von Alkoholen und Phenolen verwendet. Als Lösungsmittel dienen u.a. Tetrahydrofuran oder Dimethylformamid.

Ich erreichte mit dieser Methode eine annähernd quantitative O-Methylierung von Maltol und Isomaltol. 26, 27 und 28 ließen sich nur in schlechten Ausbeuten umsetzen. Ich beobachtete eine Dunkelfärbung des Reaktionsgemisches und die Bildung mehrerer nicht identifizierter Nebenprodukte. Dies trifft vor allem bei Versuchen zu, Gemische der genannten Substanzen zu derivatisieren.

In den Verbindungen 26, 27 und 28 liegt eine durch den Elektronenzug der Carbonylgruppe aktivierte Methylengruppe vor. Es ist deshalb möglich, daß durch die starke Base Natriumhydrid Nebenreaktionen, z.B. Kondensationen in den Vordergrund treten. Bekanntlich wird die Bildung von Melanoidinen u.a. auf eine Kondensation von 27 zurückgeführt.²²⁾

Aufgrund dieser Ergebnisse ist diese Derivatisierungsmethode meiner Ansicht nach für die Analyse von Bräunungsreaktionen nicht geeignet.

Triäthylxoniumtetrafluoroborat:

Tertiäre Oxoniumsalze spalten leicht ein Alkylkation ab und sind deshalb sehr starke Alkylierungsmittel.

Mit Triäthylxoniumtetrafluoroborat sollte daher eine Derivatisierung von Alkoholen und Enolen unter neutralen Bedingungen möglich sein.

Beim Versuch, Maltol direkt mit diesem Reagenz umzusetzen isolierte ich nicht umgesetztes Ausgangsprodukt. Auch wenn man bei der Reaktion Natriumhydrogencarbonat als säurebildendes Mittel zusetzt, ist die Umsetzung nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden nicht vollständig, und durch die Bildung von Nebenprodukten beeinträchtigt.

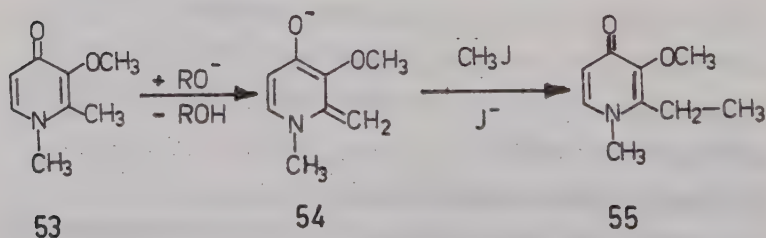
Eine vollständige Methylierung erreichte ich dagegen bei der Umsetzung des Natriumsalzes von Maltol mit Triäthylxoniumtetrafluoroborat in Methylenchlorid. Auch diese Methode versagt wegen der zunächst basischen Reaktionsbedingungen bei 26, 27 und 28, ist also für die Derivatisierung von Extrakten aus Modellreaktionen oder Lebensmitteln nicht geeignet.

Thallium(1)-äthylat/Methyljodid:

Umsetzungen der Thalliumsalze von Hydroxyverbindungen mit Methyljodid wurden bereits früher beschrieben.²²⁾

Eine umfangreiche Untersuchung über die Verätherung von Diolen, Triolen und Hydroxycarbonsäuren mit Thallium-(1)-alkoholat und Methyljodid zeigt, daß dieses Reagens bei Benzylalkohol, Benzoin, bei Kohlenhydraten und Amino-hydroxyverbindungen versagt. Bei Glycerin werden nur die primären OH-Gruppen veräthert.³⁴⁾

Ich konnte feststellen, daß durch Methyljodid und Thallium-äthylat in Acetonitril Maltol in 12 Stunden quantitativ methyliert wird. Das Pyridon 51 reagiert unter gleichen Bedingungen nicht so einheitlich. Aus dem Reaktionsgemisch wurden nach schichtchromatographischer Trennung mit Benzol/Methanol auf Kieselgel zwei Substanzen isoliert. Neben dem Methyläther tritt noch eine Verbindung mit der Masse 167 auf. Diese entsteht vermutlich durch eine zusätzliche C-Methylierung an der durch die Carbonylgruppe aktivierten Methylen-Gruppe in 2-Stellung. (55)



Zusammenfassend kann man feststellen, daß keine der untersuchten Methoden zur Methylierung von so reaktiven Substanzgemischen, wie sie in Extrakten aus gebräunten Zuckern vorliegen, geeignet ist. Schwierigkeiten bereiten u. a. die nebeneinander vorliegenden reaktiven Carbonylgruppen und CH-aciden Verbindungen, da leicht unerwünschte Kondensationen eintreten können. Hier würde möglicherweise eine Derivatisierung der Carbonylgruppen ein besseres Ergebnis bringen.

III) Untersuchung von Bräunungsreaktionen verschiedener Zucker

Bisher wurden in unserem Arbeitskreis Bräunungsreaktionen von Zuckern vorwiegend in wässrigen Lösungen in einem Temperaturbereich von 70°C bis 100°C durchgeführt.

Dabei wurde eine große Anzahl von flüchtigen Verbindungen isoliert. Bei der Herstellung von manchen Lebensmitteln werden jedoch in den äußeren Schichten höhere Temperaturen erreicht. In diesen wasserarmen Randzonen tritt Bräunung, Krustenbildung und die Ausbildung des Röstaromas ein, z.B. in der Kruste von Brot.

Eine vergleichende Untersuchung der Bräunungsreaktionen, die das unterschiedliche Verhalten von Zuckern beim Erhitzen in wässrigen Lösungen und unter wasserarmen Bedingungen, sowie das Verhalten verschiedener Zucker unter denselben Versuchsbedingungen vergleicht, fehlte bisher. Auch über den Einfluß der Aminkomponente auf die Mengenrelationen der flüchtigen Hauptprodukte liegen bisher nur wenige Ergebnisse vor.

Ich habe daher die in Lebensmitteln häufig vorkommenden Zucker unter Zusatz verschiedener Mengen von Methylammoniumacetat bzw. Glycin trocken erhitzt. Die Bräunungsreaktion wurde teilweise auch ohne Amin sowie in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, daß sie lebensmitteltechnologischen Prozessen wie

z.B. Rösten, Braten oder Kochen ähnlich sind. Die mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren flüchtigen Anteile wurden gaschromatographisch untersucht. Dabei war vor allem von Interesse, in welchem Mengenverhältnis die flüchtigen Hauptprodukte unter den jeweiligen Bedingungen auftreten.

1.) Karamelisierung von Fructose und Maltose:

Fructose und Maltose wurden im Becherglas solange erhitzt, bis die entstehende Schmelze sich dunkelbraun färbt.

Dabei steigt die Temperatur bis ca 160°C an.

Das Karamelisierungsprodukt wurde in Wasser gelöst, mit Methylenchlorid extrahiert und mittels GC-MS-Technik untersucht.

Als Hauptprodukt findet man bei Fructose und Maltose Hydroxymethylfurfurol (26), daneben Bis-(5-formyl-2-furfuryl)-äther (57), Methylfurfurol (59) und Furfurol (56). Hydroxyacetylfuran (27) und 2,3-Dihydroxy-6-methyl-pyran-4-on (28) sind nur in Spuren enthalten. Im Karamelisierungsansatz von Maltose ist außerdem Maltol in geringen Mengen zu finden.

In den Chromatogrammen 5 und 6 ist ein Peak mit der Masse 204 enthalten. Zur Isolierung dieser Substanz wurde der Extrakt aus der Fructosekaramelisierung schichtchromatographisch auf Kieselgel aufgetrennt und die fluoreszenz-

löschen Zone unmittelbar unter dem Bis-(5-formyl-2-furfuryl)-äther ausgekratzt und eluiert. Man erhält ein farbloses Öl.

Das NMR-Spektrum zeigt zwei Dubletts bei 7,24 ppm ($J=3\text{Hz}$) und bei 8,12 ppm ($J=3\text{Hz}$) für vier Furanprotonen, ein Singulett bei 5,11 ppm für zwei Methylenprotonen und ein Singulett bei 10,44 ppm für zwei Aldehydprotonen.

Aus dem Massenspektrum (s.exp.Teil) und den NMR-Daten ergibt sich die Struktur von Bis-(5-formyl-2-furanyl-2-)-methan. (58)

Diese Substanz wurde bisher noch nicht als Karamelisierungsprodukt beschrieben.

Bei der Interpretation des Massenspektrums konnte ich eine Studie von Ferretti und Flanagan ³⁵⁾ als Vergleich heranziehen.

Sie untersuchten das Abspaltungsmuster von verschiedenen Acylderivaten von 2,2'-Difurfurylmethan.

PERKINELMER
SPECTROSPIN

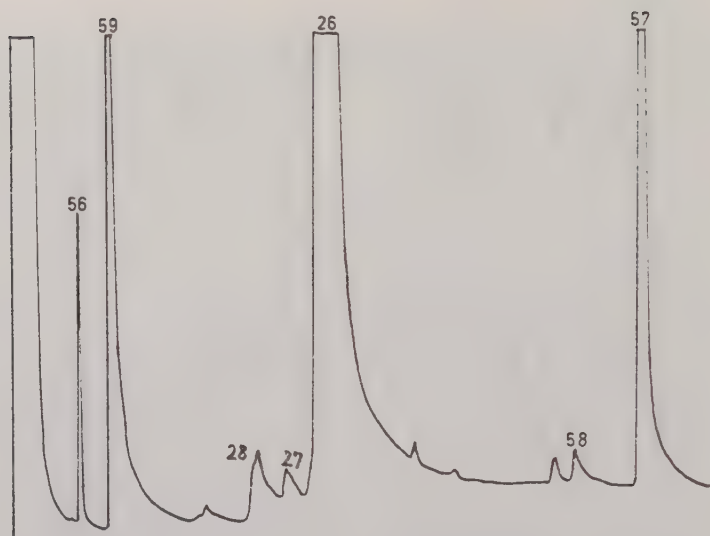
MPHS-
Spectrum

Name: _____
Date: _____
Time: _____
Operator: _____
Comments: _____

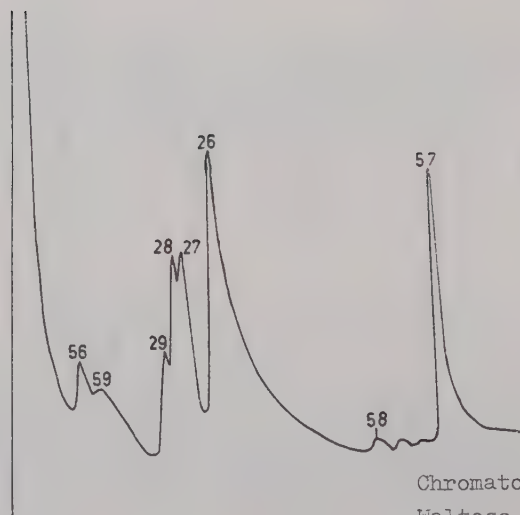


10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ppm



Chromatogr. 5
Fructose Kar.

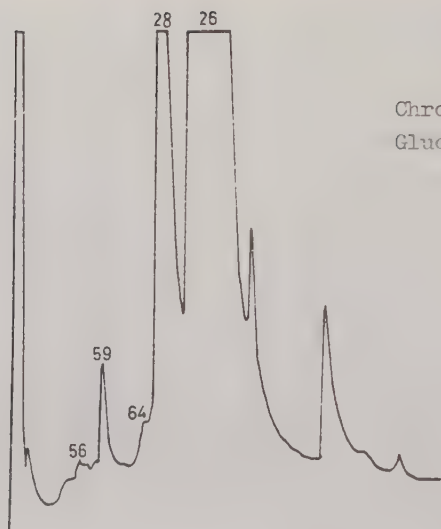


Chromatogr. 6
Maltose Kar.

2. Karamelisierung mit Glycin

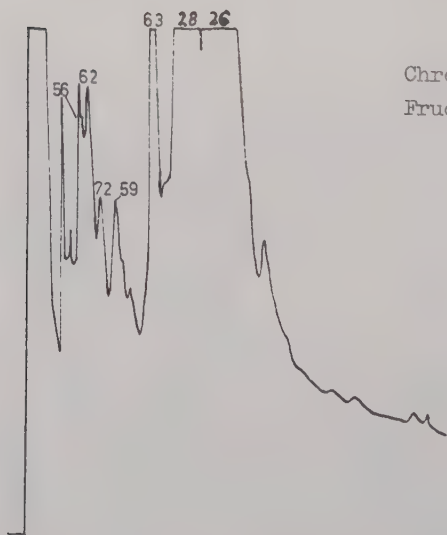
Führt man die Karamelisierung von Zucker mit Glycin im Molverhältnis 2:1 durch, so tritt bei Glucose, Fructose, Lactose und Saccharose neben Hydroxymethylfurfurol vor allem das Dihydropyranon 2C als weiteres Hauptprodukt auf und zwar bei allen untersuchten Zuckern in einem annähernd konstanten Mengenverhältnis von 2:1. Maltol (29) wird nur beim Erhitzen von reduzierenden Disacchariden mit Aminen in größerer Menge gebildet.

Beim Erhitzen von Saccharose konnte ich es weder in Ansätzen mit Glycin noch mit Methylammoniumacetat nachweisen. (Chromatogr. 7 bis 10)



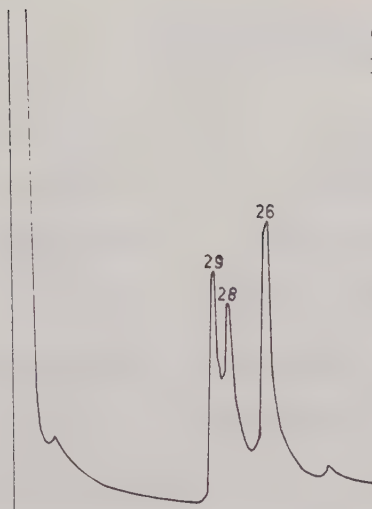
Chromatogr. 7

Glucose/Glycin 2:1

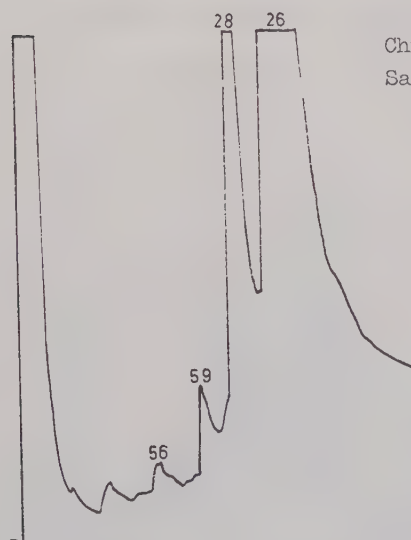


Chromatogr. 8

Fructose/Glycin 2:1



Chromatogr. 9
Lactose/Glycin 2:1



Chromatogr. 10
Saccharose/Glycin 2:1

5. Karamelisierung mit Methyllummoniumacetat:

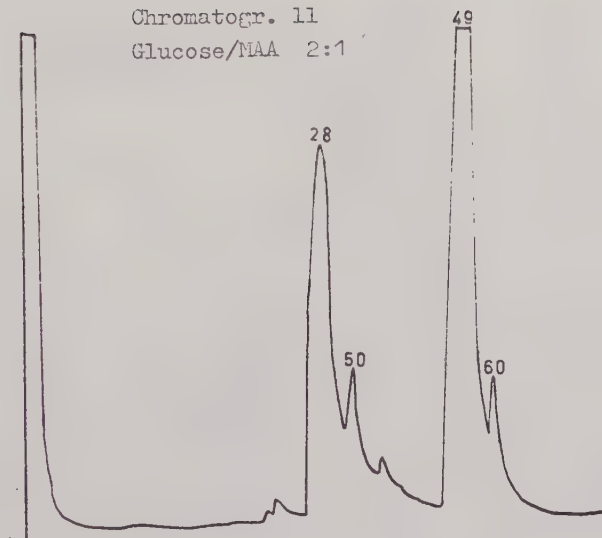
3a) in molarem Verhältnis

Glucose und Fructose wurden mit Methyllummoniumacetat (MAA) im Molverhältnis 2:1, Maltose Lactose und Saccharose im Verhältnis 1:1 trocken erhitzt. Die Schmelze wurde nach dem Abkühlen in Wasser gelöst und mit Methylenchlorid extrahiert. (vgl. Chromatogr. 11 bis 15)

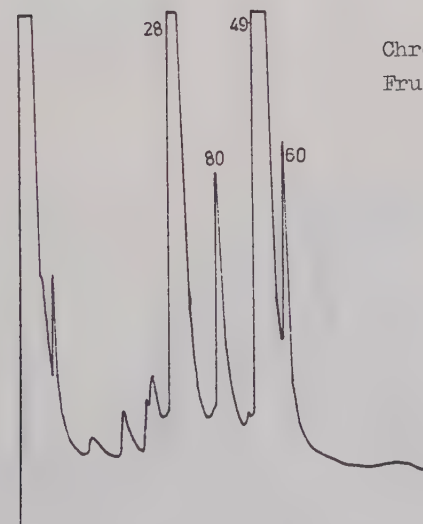
Erwartungsgemäß sind in diesen Ansätzen neben den Zuckerabbauprodukten auch N-methylanaloge Verbindungen enthalten. Das N-methyl-Pyridon 51 konnte wegen der geringen Flüchtigkeit gaschromatographisch nicht erfaßt werden.

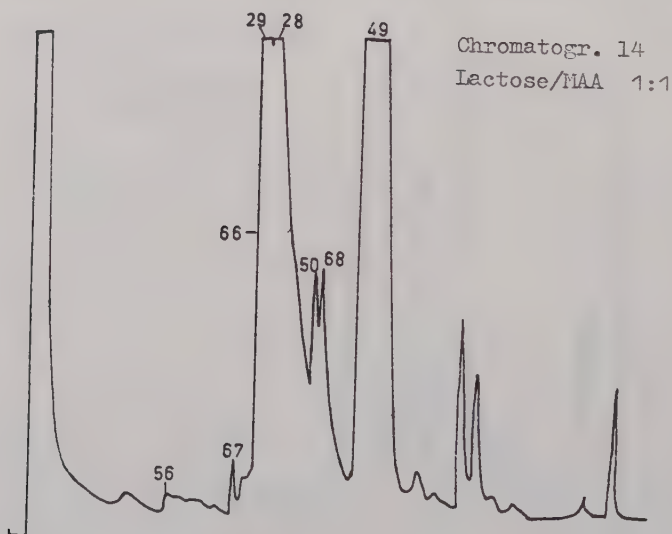
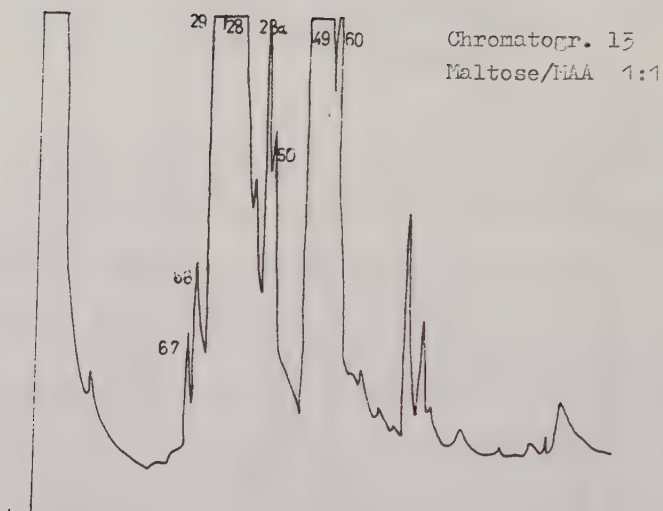
Es wurde deshalb nach dünnschichtchromatographischer Trennung durch die charakteristische Färbung mit Eisen-III-Chlorid nachgewiesen.

Chromatogr. 11
Glucose/MAA 2:1

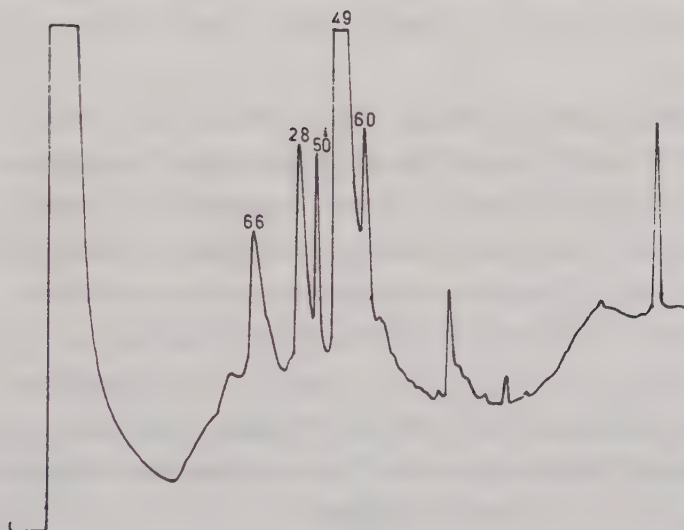


Chromatogr. 12
Fructose/MAA 2:1





Chromatogr. 15
Saccharose/MAA 2:1



Bei der Umsetzung von Mono- und Disacchariden ist das Dihydropyron 28 wichtiges Hauptprodukt. Aus reduzierenden Disacchariden entsteht zudem Maltol in vergleichbaren Mengen. Aus Saccharose und aus Monosacchariden entstehen keine nachweisbaren Mengen von Maltol, auch 28 ist hier nur in relativ geringen Konzentrationen zu finden.

Bemerkenswert ist ferner, daß bei einem großen Amin/Zuckerverhältnis kein Hydroxymethylfurfurol nachgewiesen werden konnte, sondern nur die N-methylanaloge Verbindung 49. Diese wird aus allen untersuchten Zuckern als flüchtiges Hauptprodukt gebildet und liegt teilweise auch als Acetylderivat (60) und in Spuren auch als O-Methylderivat (61) vor. Im Vergleich dazu liegt das N-methylanaloge von Hydroxyacetylfuran in wesentlich geringerer Konzentration vor, und zwar bei allen untersuchten Zuckern in etwa gleichen Mengen.

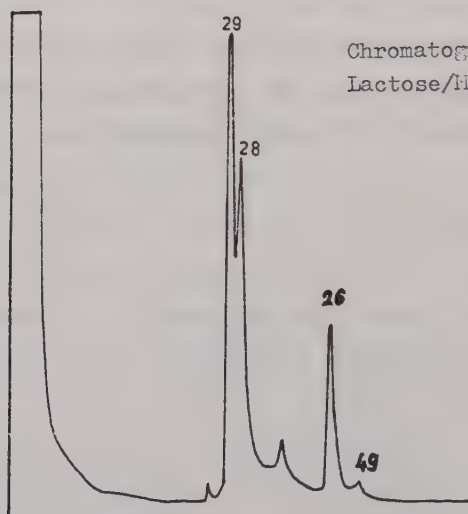
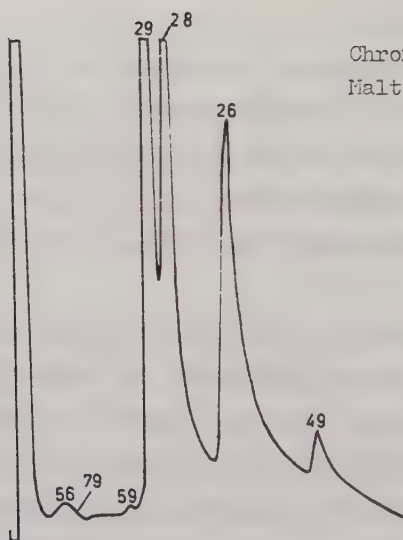
Das N-methylpyridon 51 tritt vor allem in Bräunungsgemischen von Maltose und Lactose als ein wichtiges Hauptprodukt in ungefähr gleichen Mengen auf wie Maltol (29). Im Gegensatz zu 29 konnte es bei Glucose, Fructose und Saccharose nur als Nebenprodukt nachgewiesen werden.

5b. Im Molverhältnis 10:1

Führt man die Karamelisierung von Maltose und Lactose mit geringen Mengen von Methylanmoniumacetat durch, (Molverhältnis 10:1) so werden Maltol, das Dihydropyranon 28 und daneben noch Hydroxymethylfurfurol als flüchtige Hauptprodukte gebildet, wobei Maltol gegenüber 28 etwas überwiegt. (vgl. Chromatogr. 16 und 17)

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Karamelisierung von Lactose mit Glycin im Verhältnis 2:1 (siehe Chromatogramm 9). Unterschiede bestehen hinsichtlich den gefundenen Mengen von Hydroxymethylfurfurol 26. Während 26 in den Glycinkatalysierten Ansätzen als Hauptprodukt auftritt, ist hier der Gehalt im Vergleich zu Maltol deutlich erniedrigt.

Dieses Ergebnis ist von praktischer Bedeutung, weil in vielen Lebensmitteln z.B. Malz und Brot, die Zucker im Verhältnis zum Eiweiß im Überschuß vorliegen.



Die Karamelisierungsansätze von Glucose, Fructose, Maltose und Lactose mit Methyllumoniumacetat wurden auch auf die Bildung von Nebenprodukten untersucht. Zunächst wurde der Methylenchloridextrakt mit Äther über eine Kieselgelsäure chromatographiert. Das Äthereluat wurde auf präparativen Kieselgelplatten mit dem Fließmittelsystem Toluol/Essigester (3:1) weiter aufgetrennt und die einzelnen Zonen mittels GC-MS-Technik untersucht. (Chromatogr. 18 - 25)

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Erläuterung:

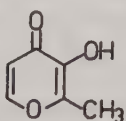
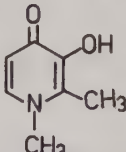
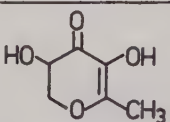
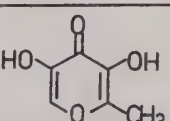
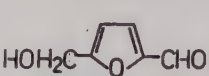
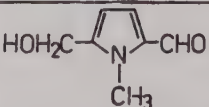
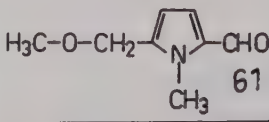
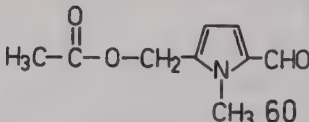
xxx - Hauptprodukte

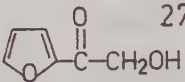
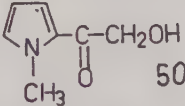
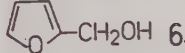
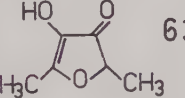
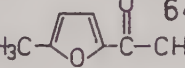
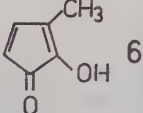
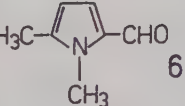
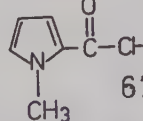
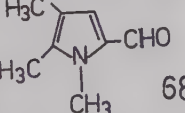
xx - Nebenprodukte

x - in Spuren nachgewiesen

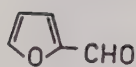
Spalte:

1	Glucose/MAA	2:1 Kar
2	Fructose/MAA	2:1 Kar
3	Maltose/MAA	1:1 Kar
4	Lactose/MAA	1:1 Kar
5	Maltose/MAA	1:1 H ₂ O (vgl. Seite 63)
6	Lactose/MAA	1:1 H ₂ O (vgl. Seite 63)

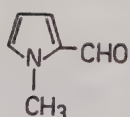
	1	2	3	4	5	6
 30			+++	+++	+	+
 51	++	++	+++	+++	+	+
 28	+++	+++	+++	+++	++	++
 28a		+	+	+		
 26	(+)	(+)	(+)	(+)		
 49	+++	+++	+++	+++	++	++
 61	++		++			
 60	+++	+++	+	+		

	1	2	3	4	5	6
 27 <chem>O=C(O)Cc1ccoc1</chem>	(+)	(+)				
 50 <chem>CC1(C)CCN1C(=O)CO</chem>	+++	+++	+	++		
 62 <chem>OCc1ccoc1</chem>	++	++	+	+	+++	+++
 63 <chem>CC1=C(C)OC(=O)C1O</chem>		++	+	+		
 64 <chem>CC(=O)c1cc(C)oc1</chem>	+			+		
 65 <chem>CC1=C(C)OC(=O)C1O</chem>		+		+		
 66 <chem>CC1(C)CCN1C=O</chem>	++	++	+	+	++	++
 67 <chem>CC1(C)CCN1C(=O)C</chem>	+	++	+	+		
 68 <chem>CC1(C)CCN1C=O</chem>			+	+		

Das Bräunungsgemisch aus Lactose/Methylammoniumacetat wurde besonders eingehend untersucht, es konnten zusätzlich folgende Verbindungen isoliert werden:



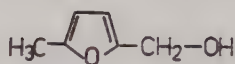
56



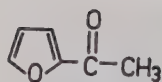
69



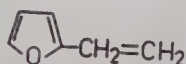
70



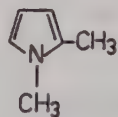
71



72



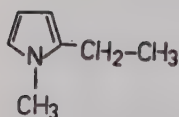
73



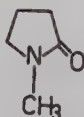
76



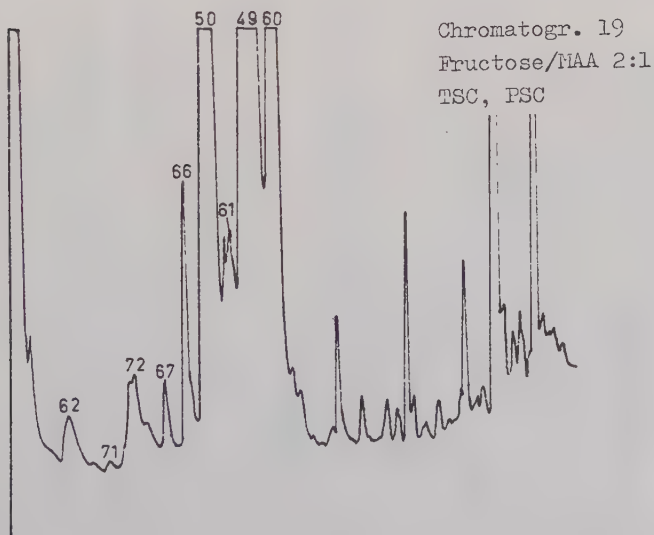
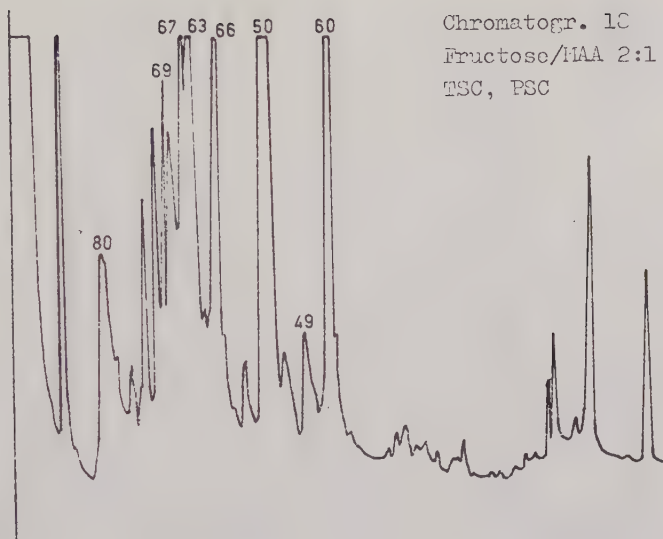
75



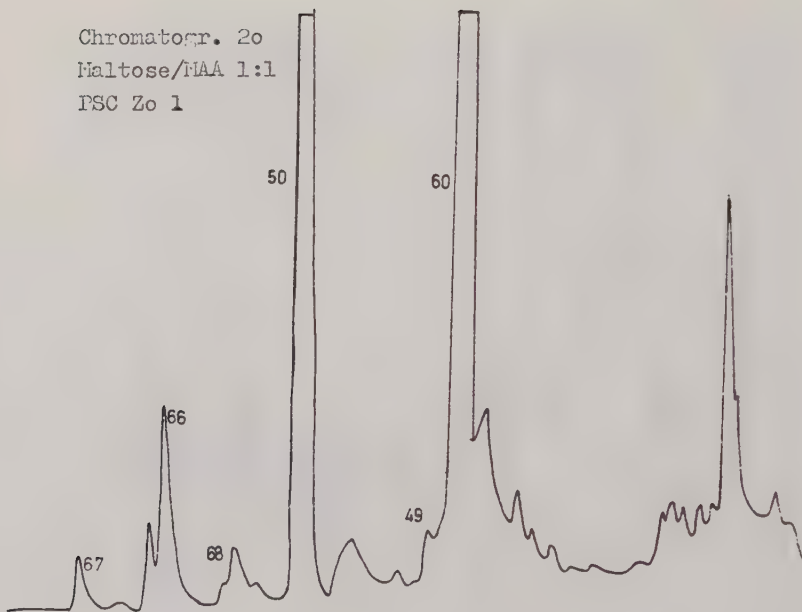
77



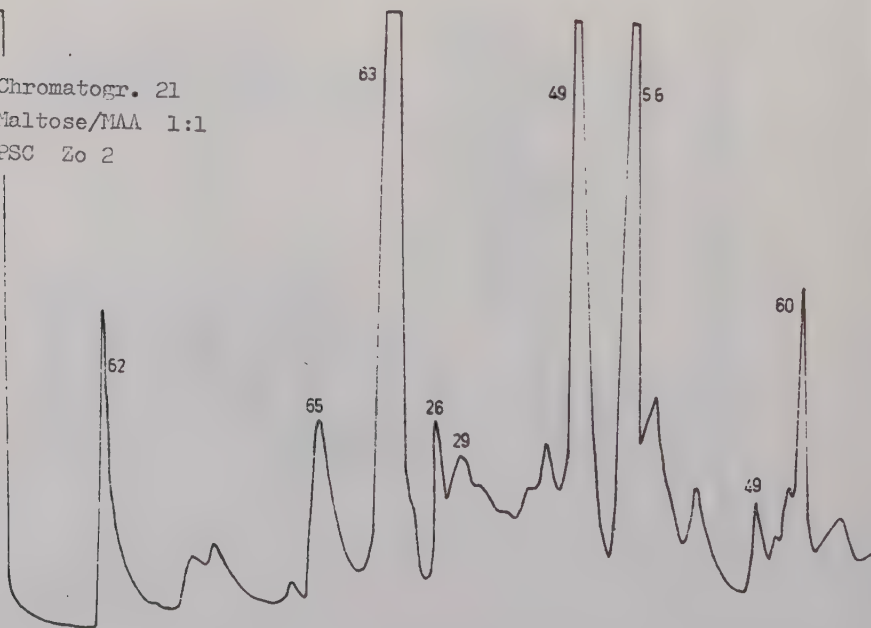
78

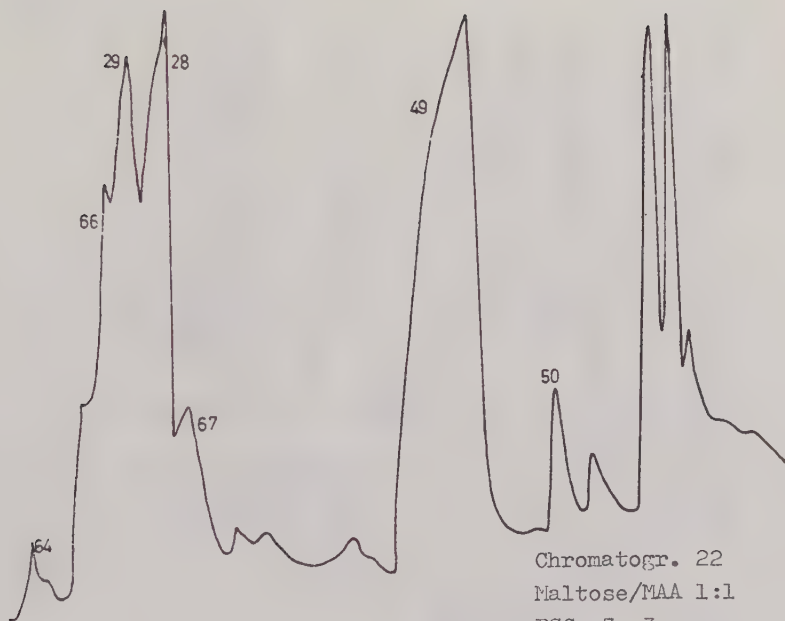


Chromatogr. 20
Maltose/MAA 1:1
PSC Zo 1

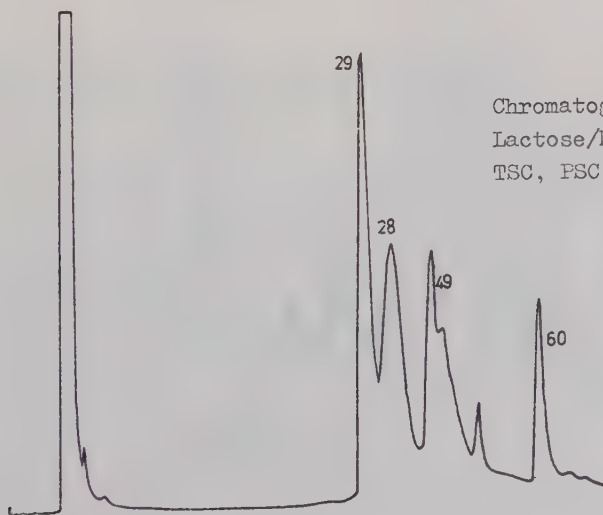


Chromatogr. 21
Maltose/MAA 1:1
PSC Zo 2

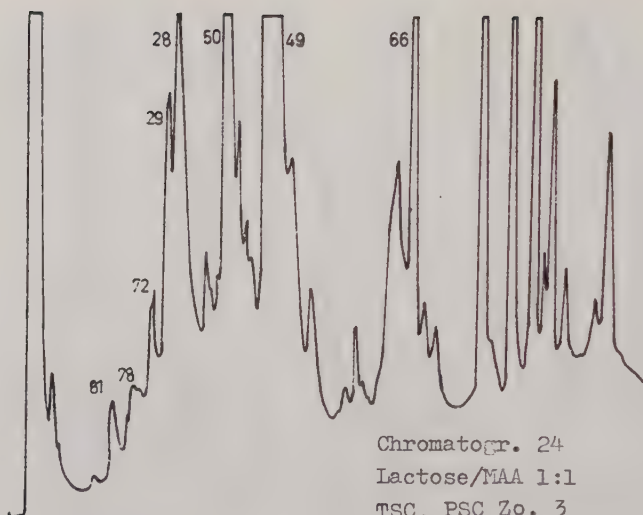




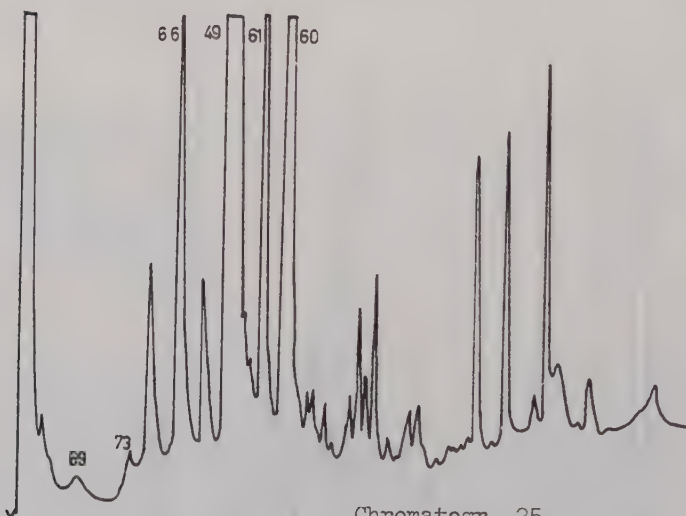
Chromatogr. 22
Maltose/MAA 1:1
PSC Zo.3



Chromatogr. 23
Lactose/MAA 1:1
TSC, PSC Zo. 1



Chromatogr. 24
Lactose/MAA 1:1
TSC. PSC Zo. 3



Chromatogr. 25
Lactose/MAA 1:1
TSC, PSC Zo. 3

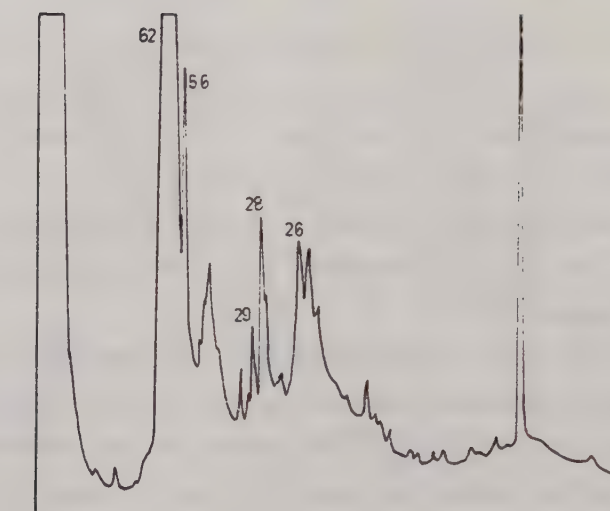
Nachweis von Isomaltol

Bei der Untersuchung des aminkatalysierten Lactoseabbaus konnte ich im Methylenchloridextrakt kein Isomaltol nachweisen. Ich stellte deshalb die mit Methylenchlorid extrahierte wässrige Phase mit Phosphorsäure auf pH 1 ein und führte anschließend eine Wasserdampfdestillation durch. Aus dem Destillat läßt sich reines Isomaltol ausschütteln.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Isomaltol in einer Vorstufe vorhanden sein muß, aus der es leicht durch saure Hydrolyse gebildet werden kann. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um Galactosylisomaltol handelt.

4. Bräunungsreaktionen in wässriger Lösung

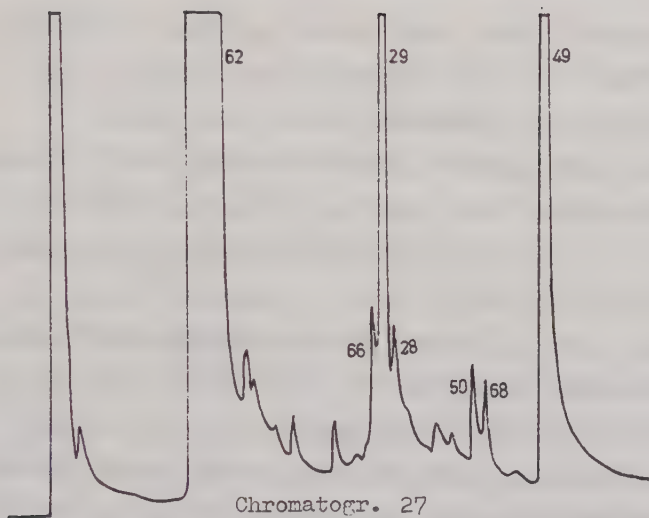
Erhitzt man Lactose mit Glycin in wässriger Lösung, so ist eine wesentlich längere Erhitzungszeit erforderlich (mehrere Stunden) um eine intensive Bräunung zu erreichen. Als Hauptprodukt tritt hier Furfurylalkohol 62 auf, daneben sind relativ große Mengen Furfurol 56 zu finden. Die Karamelisierungsprodukte Maltol, HMF und das Dihydropyranon 28 sind in verhältnismäßig geringen Mengen enthalten. (Chromatogr. 26)



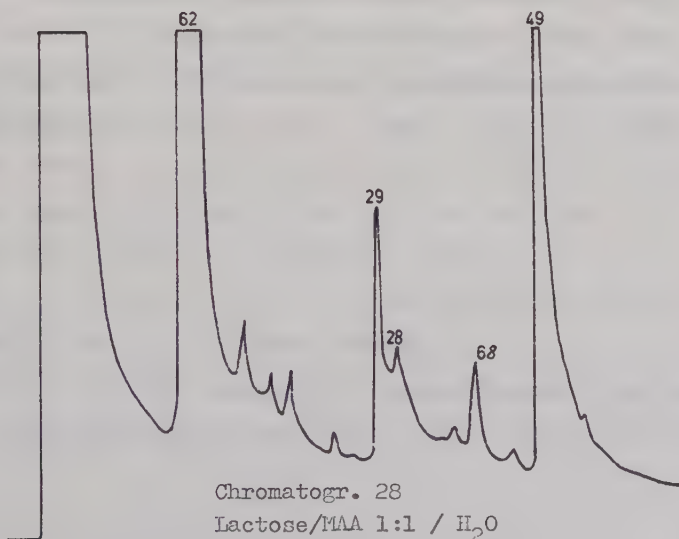
Chromatogr. 26

Lactose/Glycin 2:1 / H₂O

Auch beim Erhitzen von wässrigen Lösungen von Maltose bzw. Lactose mit Methylammoniumacetat fällt der sehr hohe Gehalt von Furfurylalkohol auf. (Chromatogr. 27, 28)
Es muß noch geklärt werden, auf welchem Weg aus Hexosen ein C-5-Körper entsteht. Beim Erhitzen von III¹ mit Methylammoniumacetat in wässriger Lösung konnte ich keine Bildung von Furfurylalkohol und 5-Hydroxymethyl-2-Formylpyrrol beobachten, statt dessen entstehen unlösliche Melanoidine.



Chromatogr. 27
Maltose/MAA 1:1 / H₂O



Chromatogr. 28
Lactose/MAA 1:1 / H₂O

IV. Untersuchung von Roggenmischbrot

Brotaroma ist schon seit langem Gegenstand von Untersuchungen. Vor allem Weißbrot wurde in letzter Zeit häufig und mit erheblichem Aufwand analysiert.

Folkers und Gramshaw beschreiben in ihrer 1977 veröffentlichten Arbeit viele flüchtige Verbindungen.³⁶⁾ Auch

Mulders hat umfangreiche gaschromatographische Untersuchungen über Weißbrotaroma durchgeführt.³⁷⁾ Rothe und

Thomas haben mit dünnschichtchromatographischen Methoden verschiedene Brotsorten auf ihren Gehalt an einigen ausgewählten Carbonylverbindungen hin untersucht, sowie deren Verteilung zwischen Krume und Kruste verfolgt.³⁸⁾

In den genannten Arbeiten werden vor allem die leichtflüchtigen Komponenten im Weißbrot erfaßt. Ich habe dagegen die Bildung schwerflüchtiger Verbindungen in einem dunklen Roggenmischbrot untersucht.

Eine Zusammenfassung der Kenntnisse über Brotaroma hat M. Rothe in dem Buch "Aroma von Brot" zusammengestellt.³⁹⁾

Bei der Brotbereitung führen die Vorgänge während der Fermentation zu einem enzymatischen Abbau der Stärke, wobei Glucose, Maltose und höhere Oligosaccharide entstehen. Diese werden im Sauerteig durch Mikroorganismen, vor allem Hefen und Lactobazillen zu verschiedenen Gärungsprodukten abgebaut. Die im Teig vorhandenen Zucker sind Voraussetzung für die während des Backprozesses ablaufenden Maillard-Reaktionen.

1.) Extraktionsverfahren

Bei der Untersuchung der schwerflüchtigen Anteile des Brotaromas ist zu berücksichtigen, daß die polaren Substanzen in dem stark gequollenen und verkleisterten Stärkegerüst der Brotkruste fest eingeschlossen und relativ schwer zugänglich sind. Unpolare Lösungsmittel wie Äther oder Methylenchlorid benetzen das Untersuchungsmaterial schlecht, deshalb ist damit zu rechnen, daß einige Maillardprodukte nur unvollständig extrahiert werden.

Der Versuch, die Brotkruste in heißem Wasser weitgehend aufzuweichen und anschließend mit Methylenchlorid zu extrahieren führte zur Bildung von Emulsionen, die sich nur schwer brechen ließen. Ich entschied mich daher für eine Extraktion mit heißem Methanol.

Hierbei wird ein Quellen des Untersuchungsmaterials verhindert, trotzdem werden auch polare Substanzen gut elu-

iert und man erhält große Ausbeuten eines dunkelbraunen, aromareichen Extraktes.

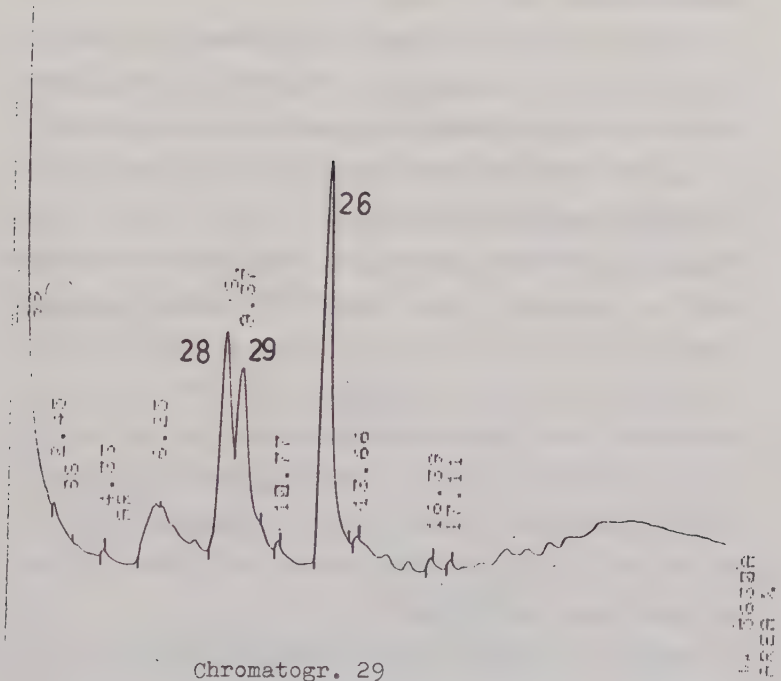
Aus dem methanolischen Extrakt wurden störende Lipide durch Extraktion mit Petroläther abgetrennt, der Rückstand in Wasser gelöst und durch Extraktion mit Methylenchlorid in zwei Fraktionen aufgeteilt.

2. Untersuchung von Fraktion I

Die Methylenchloridfraktion (Fraktion I) wurde im Hochvakuum destilliert und mittels GC-MS-Technik untersucht.

Wie das Chromatogramm 29 zeigt, entstehen Maltol und das Dihydropyranon 28 in etwa gleicher Menge. Während 26 in etwa doppelt so hoher Konzentration vorliegt. Dieses Ergebnis ist mit dem der Karamelisierung von Maltose mit geringen Mengen Methylammoniumacetat vergleichbar.

Es zeigt, daß in der Brotkruste kein reiner Karamelisierungsprozess stattgefunden hat, sondern, daß der Bräunungsprozess durch das im Brot enthaltene Eiweiß entscheidend beeinflußt wird.



Chromatogr. 29

Brotextrakt Fraktion I

3. Versuche zur Derivatisierung der wässrigen Phase (Fraktion II)

Der größte Anteil der Zuckerabbauprodukte ist aus wässrigen Lösungen nicht extrahierbar.

Über die Struktur der darin enthaltenen Substanzen ist relativ wenig bekannt.

Ich versuchte durch Anwendung von Derivatisierungsmethoden, die in der Zuckeranalytik gebräuchlich sind, Zugang zu den Substanzen in der wässrigen Phase des methanolischen Brotkrustenextraktes (Fraktion II) zu erhalten.

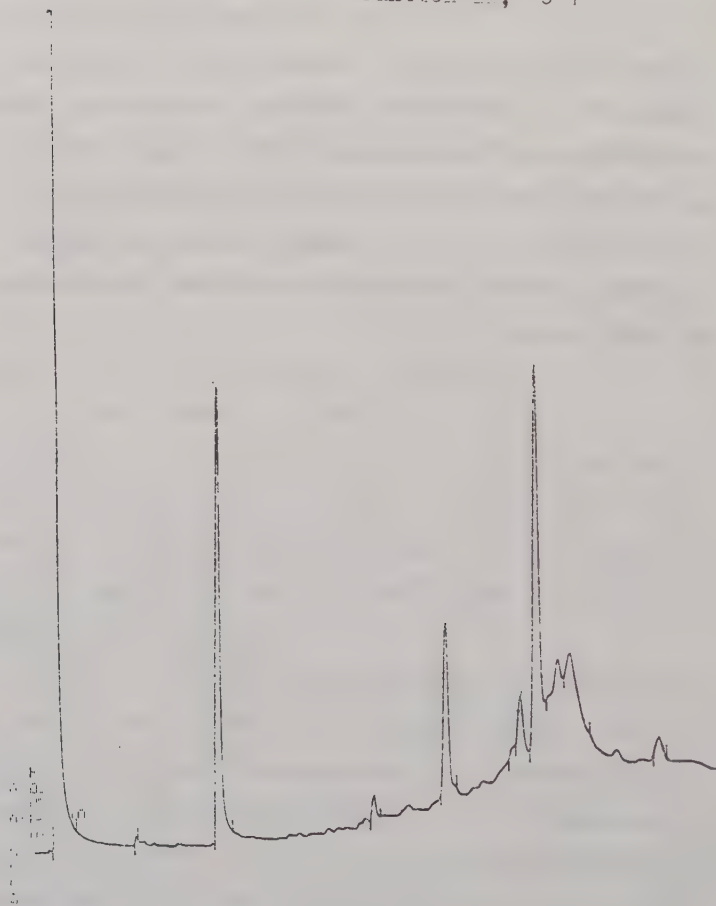
a) Methylierung nach Hakomori:

Mit diesem Verfahren lassen sich Kohlenhydrate auf einfache und schonende Weise permethylieren. Dabei kann in einem Schritt eine vollständige Umsetzung aller OH-Gruppen erreicht werden. Als Lösungsmittel verwendet man Dimethylsulfoxyd, aus diesem bildet sich bei der Zugabe von Natriumhydrid die starke Base Methylsulfinylmethylnatrium, welche die Ionisierung der OH-Gruppen bewirkt. Die entstehenden Alkoxydionen setzen sich glatt mit Methyljodid oder Dimethylsulfat um.

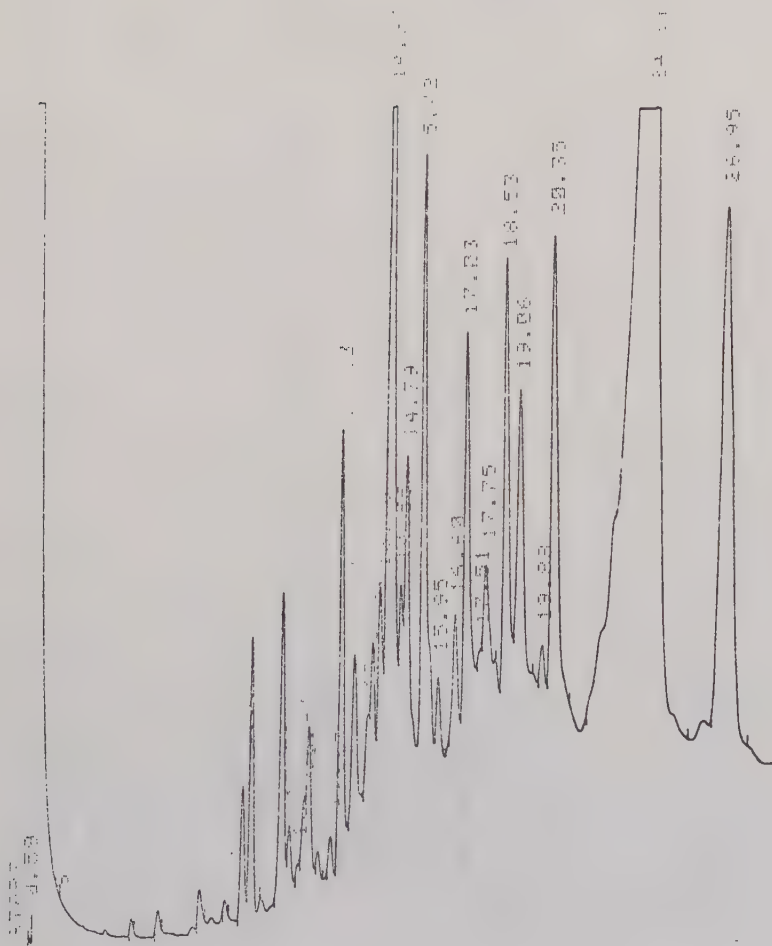
Ich wandte die Hakomori-Methylierung auf die Fraktion II des Brotkrustenextraktes an. Den methylierten Ansatz extrahierte ich mit Methylenchlorid und unterwarf ihn anschließend einer Hochvakuumdestillation. Im Temperaturbereich von 100°C bis 180°C geht ein helles, zähflüssiges Öl als Destillat über. Dieses trennte ich mittels präparativer Schichtchromatographie in **sechs** Zonen auf.

Die so erhaltenen Fraktionen wurden gaschromatographisch untersucht. Wie die Chromatogramme Nr. 30 bis 36 zeigen, lassen sich auf diesem Weg eine große Anzahl von hydrophilen Substanzen erfassen. Eine Zuordnung der einzelnen Substanzen sowie eine Strukturaufklärung steht noch aus. Bei der Interpretation der Massenspektren bestand die Schwierigkeit, daß die Molekülpeaks oft nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnten. Weiterhin ist zu beachten, daß alkalilabile Substanzen durch die starke Base Methylsulfinylnatrium angegriffen werden können. Die Bildung von Kunstprodukten kann daher nicht ausgeschlossen werden. 40

Chromatogr. 30
Fraktion II, 70 1

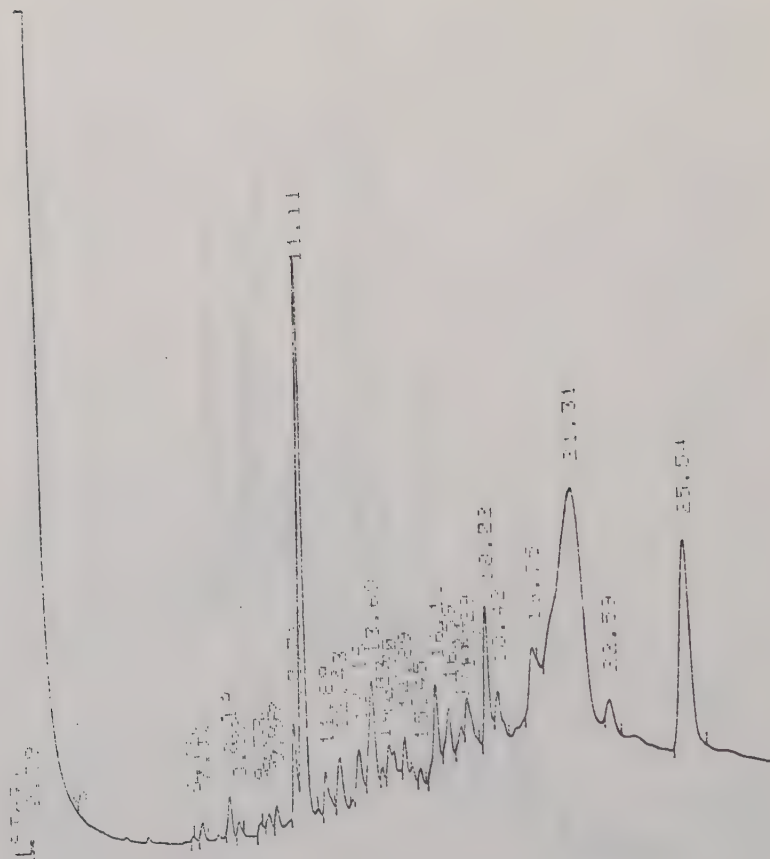


Chromatogr. 31
Fraktion II, Zo 2

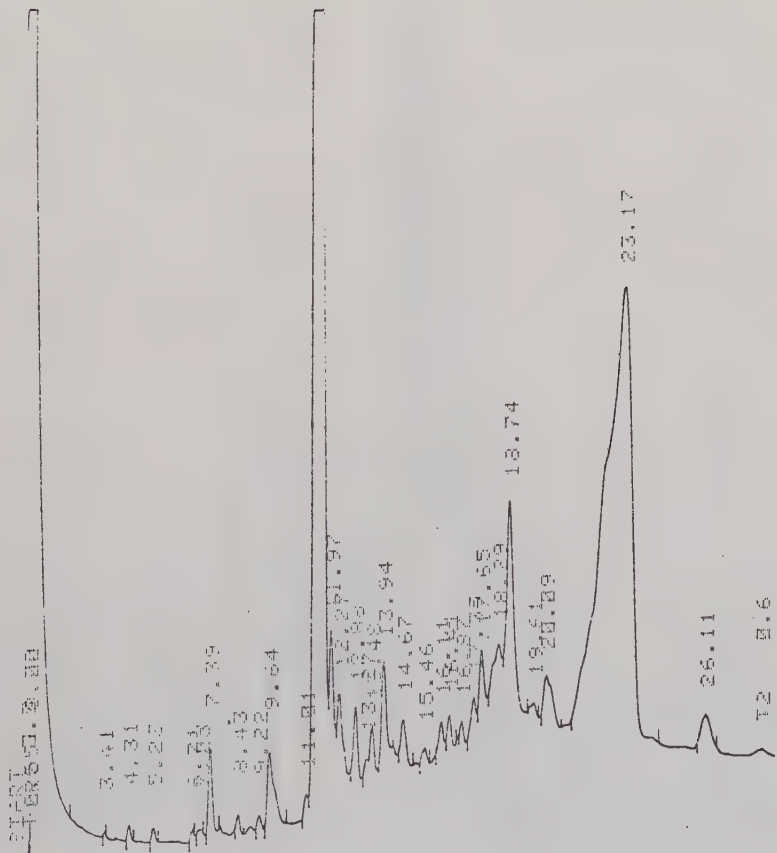


Chromatogr. 32

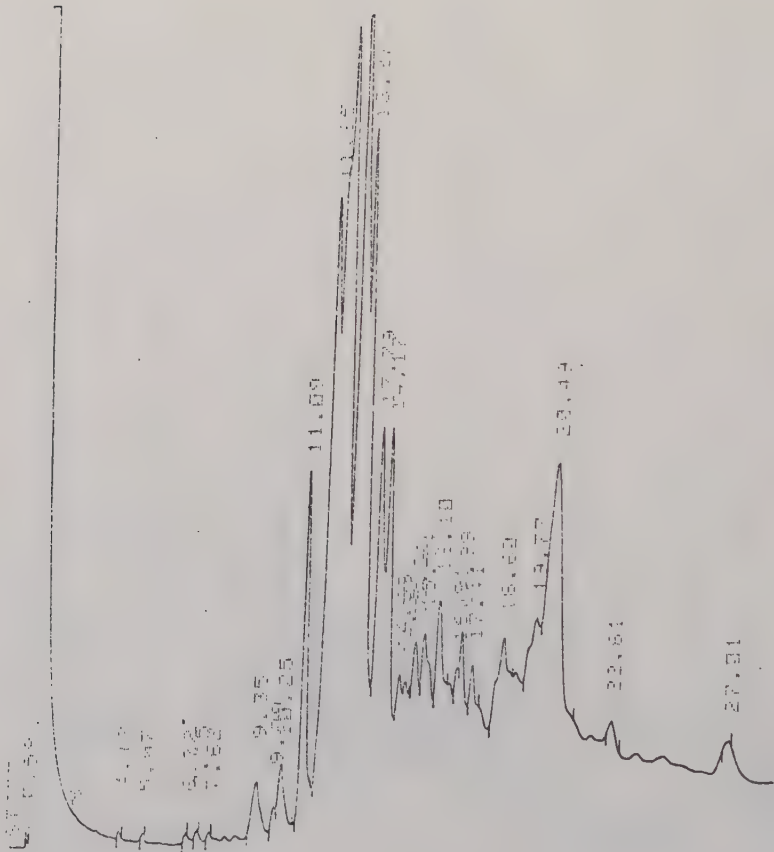
Fraction I, 403



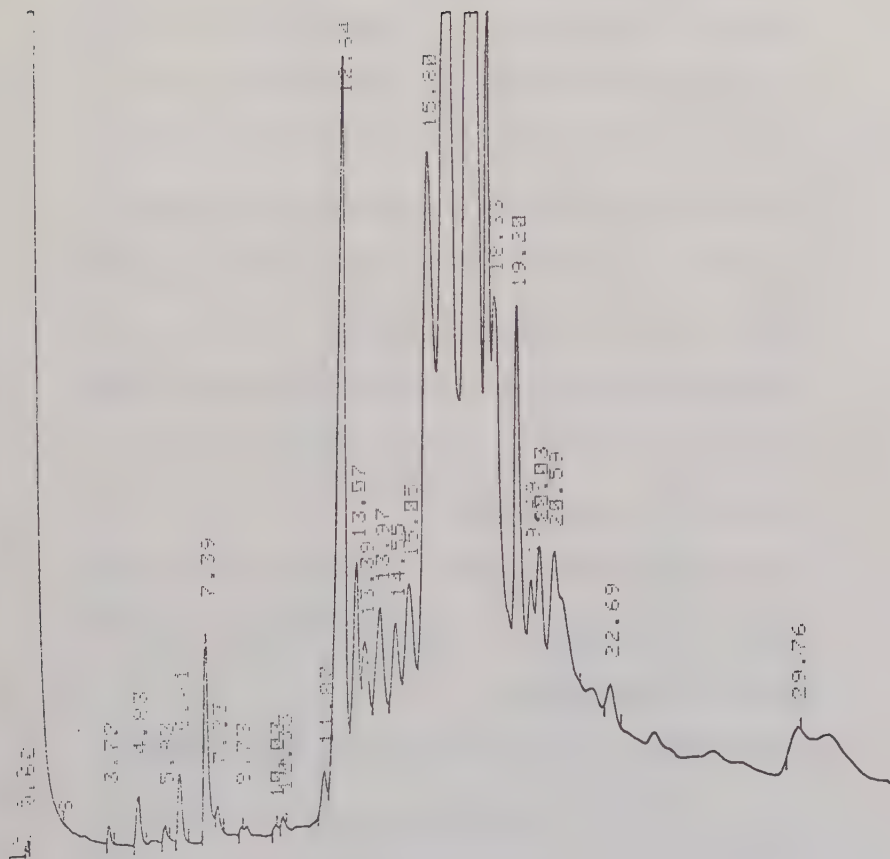
Chromatogr. 33
Fraktion II Zo 4



Chromatogr. 34
Fraktion II, "o 5



Chromatogr. 35
Fraktion II, 30 6



b.) Acetylierung:

Zur Peracetylierung von Zucker verwendet man häufig Acetanhydrid in Pyridin. Mit diesem Verfahren läßt sich ein großer Teil der Fraktion II in Derivate überführen, die mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar und im Hochvakuum flüchtig sind. Beim Verreiben des zähflüssigen Destillationsproduktes mit Äther erhielt ich eine farblose, kristalline Substanz, welche ich als peracetylierten Mannit identifizierten konnte.

Mannit ist als Bestandteil von Backmitteln zugelassen.

Er dient der Beschleunigung der Gärung sowie der Frischhaltung und bewirkt ein größeres Gebäckvolumen. ⁴¹⁾

Er wird aus verschiedenen Zuckerarten durch Gärungsprozesse gebildet, u.a. auch durch Essigsäurebakterien. Ob der gefundene Mannit während der Sauerteigführung gebildet wird oder über ein Backmittel zugesetzt wurde, bedarf noch einer weiteren Prüfung.

Die Acetylierung bietet eine bequeme Möglichkeit, Mannit in Backwaren nachzuweisen. Der acetylierte Extrakt kann auch gaschromatographisch auf Mannit geprüft werden.

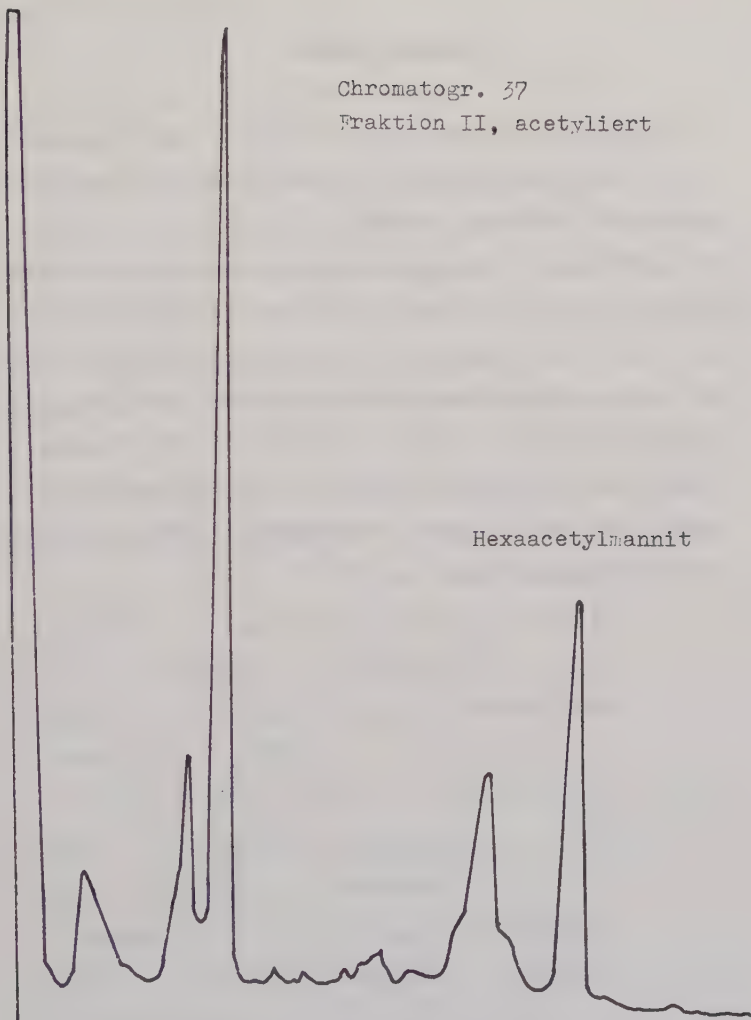
(Siehe Chromatogramm 3/.

Nähere Angaben sind im experimentellen Teil enthalten.

Chromatogr. 37

Fraktion II, acetyliert

Hexaacetylmannit



Zusammenfassung

Beim thermischen Abbau von Zuckern entstehen Substanzen, die für das Aroma und den Geschmack von erhitzten Lebensmitteln von Bedeutung sind.

Die wichtigsten flüchtigen Abbauprodukte wurden mit Hilfe der Dünnschicht- Gas- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie getrennt. Ihre Bildung beim Karamelisieren von Zuckern mit verschiedenen Mengen von Methylammoniumacetat und Glycin sowie in Brotkruste wurde untersucht. Ferner wurden einige Methoden zur Derivatisierung von Hydroxylgruppen auf ihre Verwendbarkeit für die Analytik von Bräunungsprodukten geprüft.

Literaturverzeichnis

- 1.) Reynolds, T.M., Adv. Food Res. 12, 1 (1963)
Reynolds, T.M., Adv. Food Res. 14, 167 (1965)
- 2.) Pigman, W., und Horton, D., The Carbohydrates,
second Edition Vol.IB, Academic Press New York,
London, 1972, S.881, Paulsen, H. und Pflughaupt, K.W.
- 3.) Bonner, T.G., Bourne, E.G., Ruszikiewicz, M., J. Chem.
Soc. 1960, 787.
- 4.) Miller, R.E, Cantor, S.M., J. Am. Chem.Soc. 74, 5236
(1952)
- 5.) Anet, E.F.L.J., Adv. Carbohyd. Chem. 19, 181 (1964)
- 6.) Hull, D.M.C., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1977
(15) 1977
- 7.) Shafizadeh, F., Carbohydr. Res. 71, 169 (1979)
- 8.) Shaw, P.E., Tatum, J.H., Berry, R.E.,
- 9.) Severin, Th., Seilmeier, W., Z.Lebensm.Unters.-
Forsch. 137, 1 (1968)
- 10.) Mills, F.D., Hodge, J.E., Carbohydr.Res. 51, 9 (1976)
- 11.) Mills, F.D., J.Agric.Food Chem. 27, 1136 (1979)
- 12.) Ledl, F., Schnell, W., Severin, Th.,
Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 160, 367 (1976)
- 13.) Tressl, R., Bahri, D., Köppler, H., Jensen, A.,
Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 167, 111 (1978)
- 14.) Safizadeh, F., Carbohydr. Res. 67, 433 (1978)
- 15.) Ito, H., Agr. Biol.Chem. 41, 1307 (1977)

- 16.) Mills, F.D., J.Agric.Food Chem. 25, 894 (1978)
- 17.) Shaw, Ph., Tatum, J., Berry, R., Carbohydr.Res. 16, 207 (1961)
- 18.) Peratoner, Al, Tamburello, A.,
Chem. Ber. 36, 3407 (1903)
- 19.) Brand, J., Chem.Ber. 37, 507 (1894)
- 20.) Erdmann, E., Schaefer, C., Schem.Ber. 43, 2392 (1910)
- 21.) Kasue, M., Itaya, M., Inagaki, M., Katayama, H., Kawamura, ..,
Yakugaku Zasshi 87, 47 (1967)
- 22.) Hodge, J.E., "The Chemistry and Physiology of Flavors"
H.W., Schulz, E.A., Day and L.H., Libbey, Eds.
AVS, Publishing Co. Westport (1967)
- 23.) Hodge, J.E., Nelson, E.C., Cereal Chem. 38, 207 (1961)
- 24.) Fisher, B.E., Hodge, J.E., J. org. Chem. 29, 776 (1964)
- 25.) Pippet, A.O., Rittersbach, Ph., Muraldihara, R.,
J.Agr.Food Chem. 16, 929 (1970)
- 26.) Ledl, F., unveröffentlicht
- 27.) Spingarn, N.E., Garvie, C.T., J. Agric.Food Chem.
27, 1319 (1979)
- 28.) Shibamoto, T., J. Agric.Food Chem. 28, 883 (1980)
- 29.) Bjeldanes, L.F., Chew, H., Mutat.Res. 67, 367 (1979)
- 30.) Ledl, F., Schnell, W., Severin, Th.,
Z. Lebensm.Unters.-Forsch. 160, 367 (1976)
- 31.) Ohno, K., Nishiyama, H. Nagase, H.,
Tetrahedron Lett. 45, 3305 (1979)
- 32.) Heyns, Kl, Hauber, E.,
Liebigs Ann. Chem. 733, 159 (1970)

- 33.) Menzies, R.C., J.Chem.Soc. 1947, 1378
- 34.) Kalinowski, H.D., Seebach, D., Crass, G.,
Angew. Chem. 87, 812 (1975)
- 35.) Ferreti, A., Flanagan, V.,
Organic Mass Spektrometry 8, 403 (1974)
- 36.) Folkers, D.J., Gramshaw, J.W.,
J.Food Technol. 12, 1 (1977)
- 37.) Mulders, E.J.,
Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 151, 310 (1973)
- 38.) Rothe, M., Thomas, B.,
Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 119, 302 (1963)
- 39.) Rothe, M., Handbuch der Aromaforschung,
Aroma von Brot, Akademieverlag Berlin, 1974
- 40.) Anderson, D.M.W., Dea, I.C.M., Maggs, P.A., Munro, A.C.,
Carbohydr.Res. 5, 489 (1967)
- 41.) Richtlinien für Backmittel, des Bundes für Lebens-
mittelrecht und Lebensmittelkunde e.V. vom Juni 1974
(Schriftreihe des Bundes f. Lebensmittelrecht und
Lebensmittelkunde, Heft 79, Behrs-Verlag)
- 42.) Wells, G.B., Lester, R.L., Anal.Biochem. 97, 184 (1974)

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden

Schichtchromatographie:

Dünnschichtchromatographische Trennungen erfolgen auf DC-Alufolien, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm, Fa. Merck

Präparative Schichtchromatographie erfolgte auf PSC-Fertigplatten, Kieselgel, 20 X 20 cm, Schichtdicke 2 mm Fa. Merck.

Gaschromatographie:

Hewlett Packard 5830 A Gas Chromatograph mit Hewlett Packard 18850 A GC-Terminal.

GC/MS- Kopplung:

Varian aerograph Series 2700, gekoppelt mit Massenspektrometer Varian MAT CH 7

Ionenquelle: 230°C, gemessen wurde bei 70 eV.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Pumpe: Waters Modell 6000 A

Injektionssystem: Waters Modell U6 K universal

Detektor Waters Modell 450, variable Wavelength Det.

Schreiber BBC goerz, Servogor 220, 10mV

¹H-NMR-Spektroskopie:

Brucker Spektroskop WF 80 (60 MHz)

Varian T - 60

II.) Chromatographische Trennung der Substanzen Nr.
Nr. 26, 27, 28, 29, 30, 49, 51 und 56.

1.) Dünnschichtchromatographische Trennung

Je 5 mg Substanz in insgesamt 1 ml Methylenchlorid lösen

Auftragsmenge: 2 mm aus der Schmelzpunktskapillare,

Fließmittel: Methylenchlorid: Hexan: Methanol (70:30:2)

Laufstrecke: 10 cm

Kammer: 20 X 20 X 10 cm

Sprühreagenzien:

I.) 0,5 g Eisen-III-chlorid in 100 ml Methanol lösen.

II.) 0,5 g Dinitrophenylhydrazin in 2 ml H_2SO_4 lösen,
mit Methanol auf 100 ml auffüllen.

Besprühen: zuerst mit Lösung I dann mit Lösung II, an-
schließend mit dem Laborföhn drei Minuten trocknen.

2.) Hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung

Je 10 mg Substanz in insgesamt 1,5 ml Methanol/Wasser
(3:2) lösen, diese Lösung durch eine Sep-Pak-Kartusche
filtrieren. Anschließend 5 μ l einspritzen.

Säule:

Bondapack C_{18} (Fa. Waters) Länge 30 cm i.D. 3,9 mm

Durchfluß: 1 ml/min.

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (95:5)

Detektion: Photometer bei 280 nm, Range 0,2.

3.) Gaschromatographische Trennung der Substanzen Nr. 26,
27, 28, 29, 30 und 31.

Je 5 mg Substanz in insgesamt 1 ml Methylenchlorid lösen.

Einspritzmenge: 3 l

GC:

Säule: 4,5 mtr 1/8" 2,5% SE 52 Chrom G AW-DMCS 80/100 mesh

Programm: Temp 1: 100°C, Time 1:15 min, Rate: 2°C/min

Temp 2: 280°C, Time 2:5 min.

Injektor: 280°C, Detektor 280°C.

Attenuation: 8

4.) Silylierung mit N-Methyl-N-trimethylsilylhexafluoro-
butyramid (MSHFBA)

Im Derivatisierungsrohr werden je 10 mg der Substanzen 26, 27, 28, 28a, 29 und 30 in insgesamt 4 ml Äther gelöst, dann wird durch das Septum mit der Injektionsspritze 0,5 ml MSHFBA zugegeben. Man schüttelt, bis alles gelöst ist und erwärmt im Trockenschrank 20 Minuten auf 40°C. Nach dem Abkühlen werden 3 µl in den GC eingespritzt.

GC:

Säule: 2,5 mtr 1/8" 2,5% OV 17, Chrom G W-DMGS 80-100 mesh

Programm: Temp 1: 50°C, Time 1: 10 min, Rate: 1°C/min

Temp 2: 250°C, Time 2: 10 min,

Injektor: 250°C, Detektor: 250°C

Attenuation: 7

Substanz Nr.	Retentionszeit (in min)
30	79,3
28a	81,4
29	83,5
27	85,9
26	95,6
28	99,2

2.) Methylierungsmethoden

a) Diazomethan:

200 mg Substanz in 10 ml Äther lösen, langsam eine ätherische Lösung von Diazomethan zutropfen, bis die Lösung gelb gefärbt bleibt und die Gasentwicklung beendet ist. 2 h rühren, dann das Lösungsmittel abdestillieren.

Diazomethan/Bortrifluorid:

Vorschrift wie oben.

Der in Äther gelösten Substanz werden einige Tropfen Bortrifluorid-Ätheratkomplex zugesetzt.

Diazomethan/Kieselgel:

125 mg Substanz und 6,5 g Kieselgel in 50 ml Äther suspendieren, 4 g Diazomethan, gelöst in Äther zutropfen, bei 0°C bis 10°C 4 h rühren, vom Kieselgel abfiltrieren, mit 50 ml Äther nachwaschen, Lösungsmittel weitgehend

entfernen. Nicht umgesetzte Ausgangssubstanz dünnschicht-chromatographisch abtrennen. Laufmittel: Toluol/Acetic-ester (2:1).

b) Methyljodid/Natriumhydrid:

500 mg Substanz in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran lösen, 92 mg Natriumhydrid hinzufügen, dabei rühren. (Parafin-öl vorher durch waschen mit Petroläther entfernen.) Anschließend 3 ml Methyljodid zutropfen und unter Feuchtigkeitsausschluß 8 h rühren. Von den ungelösten Anteilen abfiltrieren und zur Trockene eindampfen. Reinigung der methylierten Verbindung durch Hochvakuumdestillation.

c) Alkylierung von Maltol mit Triäthylxoniumtetrafluoroborat

500 mg Maltol in 10 ml trockenem Dimethylformamid lösen, 100 mg Natriumhydrid zugeben, warten, bis die Gasentwicklung beendet ist, unter Rühren 1 g Triäthylxoniumtetrafluoroborat, in 10 ml Methylenchlorid gelöst bei Raumtemperatur langsam zutropfen. 4 Stunden weiterrühren. Anschließend etwas Methanol zugeben, um überschüssiges Natriumhydrid zu zerstören, den Ansatz am Rotavapor einengen, mit Wasser aufnehmen, dreimal mit 20 ml Chloroform ausschütteln, die vereinigten Extrakte über Na_2SO_4 trocknen und das Lösungsmittel entfernen.

HV: farbloses Öl bei 0,1 Torr, 60°C bis 80°C.

b) Methyljodid/Natriumhydrid:

500 mg Substanz in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran lösen, 92 mg Natriumhydrid hinzufügen, dabei rühren. (Paraffinöl vorher durch waschen mit Petroläther entfernen.) Anschließend 5 ml Methyljodid zutropfen und unter Feuchtigkeitsausschluß 8 h rühren. Von den ungelösten Anteilen abfiltrieren und zur Trockene eindampfen. Reinigung der methylierten Verbindung durch Hochvakuundestillation.

c) Triäthylxoniumtetrafluoroborat: Alkylierung von Maltol

500 mg Maltol in 10 ml trockenem Dimethylformamid lösen, 100 mg Natriumhydrid zugeben, warten, bis die Gasentwicklung beendet ist, unter Rühren 1 g Triäthylxoniumtetrafluoroborat, in 10 ml Methylenchlorid gelöst bei Raumtemperatur langsam zutropfen. 4 Stunden weiterrühren. Anschließend etwas Methanol zugeben, um überschüssiges Natriumhydrid zu zerstören, den Ansatz am Rotavapor eingengen, mit Wasser aufnehmen, dreimal mit 20 ml Chloroform ausschütteln, die vereinigten Extrakte über Na_2SO_4 trocknen und das Lösungsmittel entfernen.

HV: farbloses Öl bei 0,1 Torr, 60°C bis 80°C.

IR (KBr): 2940, 2860, 1650, 1250, 1190 cm^{-1}

MS: m/e 154 (43% M^+), 139 (11), 122 (27), 82 (33),
43 (100),

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3) δ = 1,42 ppm (t, $J=7\text{Hz}$), 2.42 (s)
4,25 (q, $J=7\text{Hz}$), 6.41 (d, $J=6\text{Hz}$)
7.69 (d, $J=6\text{Hz}$).

MS: m/e 140 (32% M⁺), 111 (100), 109 (50), 97 (24),
55 (40), 53 (43).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3,30 ppm (s), 4,37 (s), 6,50 (d, J=3Hz),
7,38 (d, J=3Hz)

IR (KBr): 2920, 1740, 1470, 1180 cm⁻¹

Maltolmethyläther:

Farbloses Öl, Kp: 45°C (0,1 Torr)

MS: m/e 140 (56% M⁺), 122 (33), 95 (35), 82 (46), 69 (83),
43 (100).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2,30 ppm (s), 3,82 (s), 6,38 (D, J=6Hz),
7,73 (d, J=6Hz).

IR (KBr): 3280, 1655, 1445, 1255 cm⁻¹

Isomaltolmethyläther:

Farblose Kristalle, Schmp. 100°C

MS: m/e 140 (100% M⁺), 125 (85), 111 (23), 97 (25),
69 (52), 43 (23).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2,48 ppm (s), 4,02 (s), 6,43 (d, J=2Hz),
7,44 (d, J=2Hz)

IR (KBr): 3125, 3100, 1640, 1580, 1460, 1435 cm⁻¹

6.) Karamelisierung von Maltose und Fructose

180 g des jeweiligen Zuckers im 1000 ml Becherglas auf
der Heizplatte (400 Watt) schmelzen und bis zur intensiven
Braunfärbung erhitzen (ca. 40 min). Die Schmelze in 300 ml

heißem Wasser lösen und mit Methylenchlorid 12 h extrahieren. Je einen kleinen Teil der Extrakte in wenig Methylenchlorid lösen und mit Hilfe von GC-MS untersuchen. Der restliche Extrakt der Fructosekaramelisierung wird auf PSC mit dem Fließmittel Toluol/Essigester (3:1) chromatographiert. Aus der Zone mit Rf 0,70 - 0,80 kann die Verbindung 58 isoliert werden.

farbloses Öl, Kp 55°C (0,1 Torr)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5,11 ppm (s), 7,24 (d, $J=3\text{Hz}$), 8,12 (d, $J=3\text{Hz}$), 10,44 (s)

MS: m/e 204 (48% M^+), 176 (11), 175 (33), 149 (15),
147 (17), 119 (19), 118 (13), 91 (100), 65 (22),
43 (52)

IR (KBr) : 3120, 2930, 2850, 1675, 1500, 1400 cm^{-1}

2.) Karamelisierung mit Glycin

7,5 g Glycin wird mit der unten angegebenen Menge des jeweiligen Zuckers gemischt und im Becherglas auf der Heizplatte trocken erhitzt, bis der entstandene Schmelzkuchen dunkelbraun wird. (ca. 30 min). Nach dem Erkalten wird die Karamelmasse in heißem Wasser gelöst und mit Methylenchlorid erschöpfend extrahiert.

Glucose, Fructose: 36 g

Lactose, Saccharose: 72 g

Gaschromatographische Bedingungen:

Säule: 2,5 m, 1/8" 2,5% SE 52 auf Chrom G, AW DNCS

80/100 mesh

Programm: (Chromatogr. 7 und 8)

60°C, 3 min, Rate 4°C/min bis 280°C

(Chromatogr. 9 und 10)

50°C, 5 min, Rate 4°C/min bis 280°C

8.) Karamelisierung mit Methylanmoniumacetat

Die unten angegebenen Mengen des jeweiligen Zuckers und die entsprechende Menge Methylanmoniumacetat werden gemischt und im Becherglas auf der Heizplatte (400 Watt) geschmolzen. Die Schmelze wird ca 20 min unter ständigem Rühren bis zur intensiven Braunfärbung erhitzt. Nach dem Erkalten löst man die Karamelmasse in heißem Wasser und extrahiert erschöpfend mit Methylenchlorid.

Mischungsverhältnisse:

180 g Glucose, Fructose, Lactose bzw Maltose und 45,5 g Methylanmoniumacetat

180 g Saccharose und 22,7 g Methylanmoniumacetat

90 g Lactose bzw Maltose und 0,3 g Methylanmoniumacetat.

Einen kleinen Teil der Extrakte verwendet man direkt zur gaschromatographischen Untersuchung:

Chromatogramm 11, 14, 15 und 16:

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% SE 30 auf Chrom G AW DNCS 80 - 100 mesh

Programm: 60°C, 5 min, Rate 4°C/min bis 280°C

Chromatogramm 12 und 17

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% SE 52 auf Chrom G AW DMCS 80 -
100 mesh

Programm: 60°C, 3 min, Rate 4°C/min bis 280°C

Der größere Teil der Extrakte wird in je 200 ml Methylenchlorid gelöst, dann gibt man 40 g Kieselgel zu (Silica Woelm TSC Akt III) und entfernt das Lösungsmittel am Rotavapor. Eine Säule mit vier cm Durchmesser wird 10 cm hoch mit Kieselgel gefüllt und der aufgezogene Extrakt darübergeschichtet. Man bedeckt die Säule mit Seesand und eluiert mit 500 ml Äther.

Das Äthereluat wird weitgehend vom Lösungsmittel befreit und auf FSC-Fertigplatten (Kieselgel) aufgetragen. Diese entwickelt man mit Toluol/Essigester (3:1) und unterteilt sie wie unten angegeben in mehrere Zonen. Diese werden mit Methanol eluiert und mit Hilfe von GC-MS untersucht.

Bei Glucose und Fructose: die Zone mit Rf 0,3 bis 0,9

Bei Maltose und Lactose: Zone 1: Rf 0,05 - 0,3;

Zone 2: Rf 0,3 - 0,5; Zone 3: Rf 0,5 - 0,9.

Gaschromatographische Bedingungen:

Chromatogramm 20, 21, 22: Totalionenstromchromatogramm!

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% SE 52 auf Chrom. G AW DMCS

80 - 100 mesh

Programm: 60°C, Rate 4°C/min bis 280°C

Chromatogramm 23: 4,5 m 1/8" 2,5% SE 52 auf Chrom G AW

DMCS 80 - 100 mesh

Programm: 50°C, 5 min, Rate 4°C/min bis 280°C

Chromatogramme 24 und 25:

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% SE 52 auf Chrom G AW DMCS

80 - 100 mesh

Programm: 60°C, 3 min, Rate 4°C/min bis 280°C

9.) Bräunungsreaktionen in wässriger Lösung:

36 g Lactose bzw. Maltose und 9 g Methylanmoniumacetat bzw 7,5 g Glycin werden in 200 ml Wasser gelöst und vier Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend extrahiert man erschöpfend mit Methylenchlorid und unterwirft den Extrakt einer GC-MS Analyse.

Bedingungen: Chromatogramm 26:

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% SE 52, auf Chrom G AW DMCS

80 - 100 mesh.

Programm: 50°C, 5 min, Rate 4°C/min bis 280°C

V.) Untersuchung der Kruste von Roggenmischbrot

1.) Extraktion

Von 2 kg dunklem Roggenmischbrot (Handelsware) schält man die Kruste ab und extrahiert diese 8 h mit 1,5 l heißem Methanol. Der methanolische Extrakt wird filtriert und nach dem Erkalten 4 h mit Petroläther extrahiert, um störende Lipide zu entfernen. Anschließend destilliert man das Methanol am Rotavapor ab, nimmt den Rückstand in 500 ml Wasser auf und extrahiert 8 h mit Methylenchlorid.

HV Dest.: 0,1 Torr bis 150°C : (Fraktion I)

2.) Gaschromatographische Untersuchung von Fraktion I

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% QF 1 auf Chrom G AW DMCS

80 - 100 mesh

Programm: Temp. 1: 50°C, Time 1: 5 min, Rate 6°C/min

Temp. 2: 230°C, Time 2: 5 min.

Die wässrige Phase (Fraktion II) wird am Rotavapor eingedampft, Schaumbildung kann durch Zugabe von Isopropanol oder n-Butanol verhindert werden. Restwasser entfernt man durch wiederholtes Schleppen mit Isopropanol und Benzol.

3.) Methylierung von Fraktion II

5 g Rückstand werden in 200 ml trockenem Dimethylsulfoxyd

gelöst und unter Rühren insgesamt 5 g Natriumhydrid zugegeben. (Öl vorher durch Waschen mit Petroläther entfernen) Vorsicht, starke Erwärmung! Man läßt langsam 25 ml Dimethylsulfat zutropfen und rührt die Mischung 12 h weiter, dann gibt man vorsichtig tropfenweise Methanol zu um überschüssiges Reagenz zu zerstören und rotiert den Ansatz im Vakuum zur Trockene ein. Den Rückstand nimmt man mit 300 ml Wasser auf und extrahiert erschöpfend mit Methylenchlorid. Der Extrakt wird bei 0,1 Torr mit ansteigender Temperatur bis 130°C destilliert und mit dem Laufmittel Toluol/Essigester (2:3) chromatographiert. Die entwickelten Platten teilt man in 6 gleiche Zonen auf, eluiert mit Methanol und untersucht gaschromatographisch.

GC:

Säule: 2,5 m SP 1000 Chrom G AW DMCS 60 - 80 mesh

Programm: Temp 1: 100°C, Time 1: 5 min, Rate 4°C/min

Temp 2: 240°C, Time 2: 5 min.

12.) Acetylierung von Fraktion II und Nachweis von Mannit

3 g Substanz werden in 20 ml Acetanhydrid gelöst, mit 25 ml Pyridin versetzt und 3 h am Rückfluß erhitzt. Man gießt das Reaktionsgemisch in 300 ml Wasser, säuert mit Salzsäure an und extrahiert anschließend mit Chloroform. Der Extrakt wird über Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels in Hochvakuum bei

0,1 Torr bis 150°C destilliert. Ein Teil wird mit wenig Äther verrieben. Man erhält farblose Kristalle, die mehrmals aus Methanol umkristallisiert werden. Identifizierung der Substanz erfolgt durch Mischschmelzpunkt mit Mannithenacetat und durch Vergleich der IR-Spektren.

IR: (KBr) 2975, 2950, 1750, 1365, 1220, 1150 cm^{-1}

Schmp. 125°C

Gaschromatographische Prüfung:

Der andere Teil des Destillates wird in Methanol gelöst und gaschromatographisch untersucht: Chromatogramm Nr. 37

Säule: 2,5 m 1/8" 2,5% QF 1 auf Chrom G AW DNCS

80 - 100 mesh

Programm: Temp 1: 50°C, Rate 6°C/min, Temp 2: 240°C.

Lebenslauf

Josef Rothmoser geboren am 28.6.1952 in Baumgarten-
mühle, Kreis Ebersberg, als Sohn
des Landwirts und Müllermeisters
Josef Rothmoser und seiner Ehefrau
Therese, geb. Ametsbichler

Schulen 1958-1965 Volksschule in Straußdorf
1965-1969 Staatliche Realschule
in Ebersberg
1969-1973 Gymnasium in Grafing

Reifeprüfung Juni 1973

Berufsausbildung WS 1973/74 Studium der Lebensmittel-
chemie an der Universität München

Vorprüfung Mai 1976

Erste Staatsprüfung Dezember 1977

Seit Januar 1978 arbeite ich unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. Severin am Institut für Pharmazie und Lebens-
mittelchemie der Universität München an der vorliegenden
Dissertation.

